

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

**Aplicação de MALDI-TOF MS na caracterização de microalgas da
família Selenastraceae (Chlorophyta)**

Rodrigo Ventura de Mello

São Carlos
2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO E RECURSOS NATURAIS
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
LABORATÓRIO DE FICOLOGIA

**Aplicação de MALDI-TOF MS na caracterização de microalgas da
família Selenastraceae (Chlorophyta)**

Rodrigo Ventura de Mello

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, área de Concentração em Ecologia e Recursos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Armando A. H. Vieira

São Carlos
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

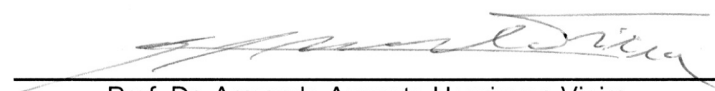
M527a Mello, Rodrigo Ventura de
Aplicação de MALDI-TOF MS na caracterização de
microalgas da família Selenastraceae (Chlorophyta) /
Rodrigo Ventura de Mello. -- São Carlos : UFSCar,
2016.
37 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2016.

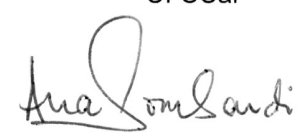
1. MALDI-TOF MS. 2. Selenastraceae. 3. Microalgas
verdes. 4. Taxonomia. I. Título.

Folha de Aprovação


Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Rodrigo Ventura de Mello, realizada em 29/06/2016:



Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira
UFSCar



Profa. Dra. Ana Tereza Lombardi
UFSCar



Profa. Dra. Cristina Souza Freire Nordi
Unifesp

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Professor Doutor Armando Augusto Henriques Vieira pela dedicação, orientação, conversas, ensinamentos, críticas e a paciência antes e durante a realização deste trabalho. Agradeço também aos órgãos de fomento (CNPq, CAPES e FAPESP) pela concessão da bolsa durante o mestrado e auxílio financeiro às pesquisas do laboratório, sem os quais não haveria o material para estudo. Também ao Professor Doutor Edson Rodrigues Filho por disponibilizar o laboratório para o desenvolvimento deste estudo.

À minha família, especialmente meus pais Ocimar e Cristina, por todo esforço que sempre empenharam para que eu pudesse estudar e que mesmo nos momentos difíceis nunca me deixaram faltar nada e meu irmão André que mesmo atrapalhando ajuda de alguma forma. Obrigado pelo apoio, por estarem sempre comigo e por não me deixarem desistir.

Ao Fabrício, pela ajuda essencial na execução desse trabalho. Ajudando nos dias e horários mais improváveis, suportando algumas boas frustrações e fazendo companhia, que é muito mais que bem-vinda sempre.

À Inessa pelas dicas e ajudas no direcionamento deste trabalho, ouvindo minhas preocupações, revisando os textos e fazendo sugestões fundamentais, principalmente nos momentos de desespero.

À minha namorada, Jéssica, por sua dedicação, paciência e carinho. Aguentando e ajudando em todos os momentos possíveis, com revisões, traduções e até mesmo broncas.

Aos meus colegas de laboratório Cilene, Guilherme, Helena, Ingritt, Letícia, Luís, Naiara e Thaís pela companhia, pelas discussões construtivas e conselhos.

Agradeço aos meus amigos Rodrigo, Daniel e Bruno que mesmo não por perto fisicamente nunca deixaram de lado o companheirismo e acompanham todos os momentos bons e ruins da pós-graduação e da vida.

Aos amigos André (Peidas), Danilo (Primo), Patrícia, Laís e Luís (Japa) pelos mais diversos momentos de descontração, seja cozinhando, conversando ou até mesmo nos ensaios da Banda.

Nada disso seria possível sem vocês.

MUITO OBRIGADO!

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curvas de crescimento obtidas pela diferença entre as absorvâncias em 680 nm e 750 nm das cepas utilizadas. Números referem-se ao código de cada espécie no banco CCMA-UFSCar. 15
- Figura 2.** Comparação entre espectros de massas altas obtidos para três cepas. O eixo horizontal representa a relação massa carga das moléculas analisadas e os eixos verticais representam a intensidade do sinal detectado pelo detector TOF. Os espectros foram cortados em 11 kDa devido à ausência de picos posteriores. 16
- Figura 3.** Comparação entre espectros de massas altas obtidos para três cepas após a subtração da linha de base. Os espectros foram cortados em 11 kDa devido à ausência de picos posteriores. 17
- Figura 4.** Comparação entre espectros de massas altas obtidos com células e com matéria orgânica dissolvida (MOD) para a cepa 326 (*H. reticulata*). A baixa intensidade de sinais no espectro de células impossibilitou a utilização dessa cepa. Os espectros foram cortados em 14 kDa por não haver picos posteriores. 17
- Figura 5.** Espectros de massas baixas obtidos para a cepa 060 (*C. sphaericum*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz. 19
- Figura 6.** Espectros de massas baixas obtidos para a cepa 333 (*A. fusiformis*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz. 20
- Figura 7.** Espectros de massas altas obtidos para a cepa 060 (*C. sphaericum*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido

Ferúlico - <i>dried-droplet</i> ; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - <i>dried-droplet</i> ; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.	21
Figura 8. Espectros de massas altas obtidos para a cepa 333 (<i>A. fusiformis</i>) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - <i>dried-droplet</i> ; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - <i>dried-droplet</i> ; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - <i>dried-droplet</i> ; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - <i>dried-droplet</i> ; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.	22
Figura 9. Cluster baseado nos espectros de massas baixas (400 - 2000 Da) das células das réplicas de cultivo.	23
Figura 10. Cluster baseado nos espectros médios de massas baixas (400 - 2000 Da) das células das cepas.	24
Figura 11. Dendrograma baseado nos espectros de massas altas (2 - 20 kDa) das células das réplicas de cultivo.	26
Figura 12. Dendrograma baseado nos espectros médios de massas altas (2 - 20 kDa) das cepas.	27
Figura 13. Comparação entre os espectros das réplicas de <i>N. lunatum</i> (065).	27
Figura 14. Exemplos de espectros de massas baixas obtidos com a MOD de diferentes cepas.	28
Figura 15. Cluster baseado nos espectros de massas altas (2 - 20 kDa) da MOD das réplicas de cultivo.	29
Figura 16. Variação da Matéria Orgânica Dissolvida (MOD) ao longo do crescimento. Espectros de massas altas com subtração da linha de base. As massas acima de 6 kDa foram omitidas por não haver picos.	31

LISTA DE SIGLAS

ACN	Acetonitrila
DHB	<i>2,5-dihydroxybenzoic Acid</i>
HCCA	<i>α-cyano-4-hydroxycinnamic Acid</i>
MALDI	<i>Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MOD	Matéria Orgânica Dissolvida
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PIE	<i>Pulsed Ion Extraction</i>
TFA	<i>Trifluoroacetic Acid</i>
TOF	<i>Time of Flight</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages</i>

RESUMO

A baixa variedade morfológica presente na família Selenastraceae tem sido uma barreira para o estabelecimento de grupos taxonômicos bem definidos. Estudos realizados com diversos marcadores moleculares já demonstraram a importância dos compostos produzidos por esses organismos na elucidação dessas relações. Nesse cenário, o presente estudo buscou avaliar a aplicação da espectrometria de massa por MALDI-TOF como ferramenta para a discriminação de cepas e espécies dessa família. Foram selecionadas 18 cepas, classificadas em 12 espécies diferentes, de microalgas de água doce. As células e a matéria orgânica dissolvida (MOD) analisadas foram amostradas de cultivos no meio da fase exponencial de crescimento. As análises foram feitas em duas extensões de massa: massas baixas (400 – 2000 Da) e massas altas (2 – 20 kDa). Para cada tipo de análise foram selecionadas as cepas que renderam espectros com boa resolução de picos. Esses espectros foram então utilizados em análises de dissimilaridade para a elaboração de dendrogramas, evidenciando a capacidade da técnica para a distinção de cepas e espécies. Apesar das cepas do gênero *Monoraphidium* não ficarem todas agrupadas, o que possivelmente ocorre devido ao fato do grupo ser polifilético. A grande rapidez e praticidade desta técnica para a obtenção de dados, aliado ao baixo custo das análises, são fatores que favorecem a sua aplicação neste tipo de estudo.

PALAVRAS CHAVE: MALDI-TOF MS, Selenastraceae, Microalgas Verdes, Taxonomia

ABSTRACT

The morphological variability in the Selenastraceae family has been a barrier to a good establishment of well-defined taxonomic groups. Several studies with molecular compounds have already demonstrated its importance in the elucidation of this relation. In this scenario, the present study used a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) technique as a tool to differentiation of the microalgae of this family at the species and strains levels. A group of 18 strains, belong to in 12 different species, of freshwater microalgae was selected. Cells and dissolved organic matter (DOM) were analyzed in the middle exponential growth phase. The analyzes were performed in two different mass ranges: 400 to 2,000 Da and 2,000 to 20,000 Da. Each strain that yielded unique spectra with a good resolution of peaks and reproducibility was selected for clusters analyzes. These spectra were used to make a dissimilarity analysis that showed the capability of differentiation of the strains and species. The strains of the genera *Monoraphidium* were not all grouped, possibly because it is a polyphyletic group. The praticity and quickness of this technique for data acquisition, allied with the low cost of the analysis, are factors that favor its application in taxonomic studies.

KEYWORDS: MALDI-TOF MS, Selenastraceae, Green Microalgae, Taxonomy

SUMÁRIO

Lista de Figuras	I
Lista de Siglas	III
Resumo	IV
Abstract	V
1. Introdução	1
1.1 Importância das Microalgas	1
1.2. Família Selenastraceae	3
1.3. Espectrometria de Massa por MALDI-TOF	3
1.4. Aplicação de MALDI-TOF MS para Microalgas	4
2. Objetivos	6
3. Material e Métodos	7
3.1. Cepas	7
3.2. Cultivos	7
3.3. Curvas de crescimento	9
3.4. Preparação das amostras	9
3.4.1. Matrizes e Métodos de Amostragem	9
3.4.2. Células	10
3.4.3. Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)	10
3.4.4. Idade do Cultivo e Variação da MOD	11
3.5. Aquisição de espectros	11
3.6. Análises de Agrupamento	12
4. Resultados e Discussão	13
4.1. Curvas de crescimento	13
4.2. Qualidade dos Espectros	16
4.3. Matrizes e Métodos de Amostragem	18
4.4. Células	23
4.4.1. Massas Baixas (400 – 2000 Da)	23
4.4.2. Massas Altas (2000 – 20000 Da)	24
4.5. Matéria Orgânica Dissolvida (MOD)	28
4.5.1. Massas Baixas (400 – 2000 Da)	28
4.5.2. Massas Altas (2000 – 20000 Da)	28
4.6. Idade do Cultivo e Variação da MOD	29
5. Conclusões	32
6. Referências	33

1. INTRODUÇÃO

1.1 IMPORTÂNCIA DAS MICROALGAS

Todo ser vivo precisa de energia, que pode, de modo geral, ser obtida através da oxidação de moléculas orgânicas energéticas (Phillipson, 1966). Essas moléculas podem ser obtidas basicamente de duas formas: consumo ou produção. Dessa forma, todo organismo incapaz de produzir moléculas orgânicas energéticas a partir de matéria inorgânica e energia, que estão disponíveis no ambiente, depende, direta ou indiretamente, daqueles que possuem tal capacidade (Begon *et al.*, 2006). Essa relação reflete a importância da comunidade produtora para a dinâmica das populações consumidoras de qualquer ambiente. Em ambientes aquáticos, uma das principais fontes de matéria orgânica é o fitoplâncton (Guschina & Harwood, 2006). Constituído por organismos autotróficos, com fotossíntese oxigênica, que vivem suspensos na coluna d'água, um dos principais grupos que compõem o fitoplâncton são as microalgas e cianobactérias (Reynolds, 2006).

O termo microalgas não possui significado taxonômico, e refere-se a um grupo artificial. É utilizado para designar principalmente organismos fotossintetizantes, eucariontes, microscópicos e que não possuem estruturas especializadas como raízes, folhas ou vasos vasculares. Podem ser unicelulares, coloniais ou filamentosos, não havendo especialização celular (Hoek *et al.*, 1995; Pulz & Gross, 2004).

É evidente a importância da produção primária das microalgas para os organismos aquáticos. Entretanto essa importância pode ser estendida, ainda que indiretamente, à animais e comunidades humanas que dependem da pesca (Likens, 1975). Humanos não são exceção no que diz respeito à necessidade de energia. Por serem organismos heterotróficos, é através do consumo de outros organismos que as necessidades energéticas são supridas. O consumo direto de microalgas não é uma prática muito difundida na sociedade, porém estudos recentes evidenciam o potencial do uso destes organismos como uma forma de complementar à nutrição humana (Spolaore *et al.*, 2006).

Contudo, a necessidade energética humana não se limita às atividades metabólicas. Existe uma grande demanda de energia para diversos processos realizados em grande escala, como produção/fabricação e transporte de produtos. Essa necessidade foi denominada como metabolismo exossomático (Georgescu-Roegen, 1975), ou seja, um conjunto de transformações energéticas que são realizadas externamente às células e

ao corpo humano. Grande parte dessa necessidade é suprida com energia proveniente da queima de combustíveis fósseis (Williams & Laurens, 2010).

A ampla utilização dessa fonte de energia, que não é renovável, tem promovido a liberação de uma imensa quantidade de carbono, na forma de gás carbônico (CO₂), na atmosfera (Williams & Laurens, 2010). O carbono liberado, a partir da queima desse tipo de combustível, implica em um aumento da quantidade desse elemento circulando na atmosfera, uma vez que o carbono fixado nos combustíveis fósseis não estava participando do ciclo (Andrade *et al.*, 2015). Esse aumento intensifica o que é conhecido como efeito estufa, pois as moléculas de CO₂ retêm parte da radiação solar que adentra a atmosfera (Rodhe, 1990).

Essas alterações têm incentivado buscas por alternativas mais sustentáveis para suprir o atual consumo de energia. Conseqüentemente, a prospecção de organismos capazes de produzir compostos que podem ser utilizados como combustível ganhou uma considerável atenção nos últimos anos (Ghasemi *et al.*, 2012). A produção de biocombustíveis a partir de microalgas possui grande potencial devido à grande produção de lipídios com a possibilidade de cultivo em diversos climas e tipos de água, como águas residuais (Ryan *et al.*, 2009).

Por outro lado, em ambientes naturais o crescimento descontrolado de populações de microalgas pode ter conseqüências desastrosas. Esses eventos em corpos de água doce podem ser resultantes de processos de poluição por grande aporte de nutrientes, esse processo é denominado eutrofização (Begon *et al.*, 2006). Essas florações podem resultar em uma depleção na quantidade de oxigênio dissolvido na água e em acúmulo de toxinas, acarretando em alguns casos em graves perdas de biodiversidade (Smith *et al.*, 1999).

Com base no acima exposto, podemos concluir que o grupo das microalgas apresenta grande importância tanto ecológica quanto econômica. Contudo ainda existem lacunas quanto ao conhecimento da diversidade dos organismos pertencentes ao grupo, da taxonomia e das interações que estabelecem na natureza (Krienitz & Bock, 2012). A variedade dos compostos que produzem e suas aplicações são áreas recentes na pesquisa biotecnológica, porém com crescente interesse de diversos pesquisadores (Bux & Chisti, 2016). Assim a caracterização e conhecimento taxonômico dos organismos desse grupo é de extrema importância para a sua aplicação prática.

1.2. FAMÍLIA SELENASTRACEAE

A família Selenastraceae é um grupo cosmopolita de algas verdes de água doce com ampla ocorrência no fitoplâncton (Krienitz & Bock, 2012). Essa família é constituída exclusivamente por organismos unicelulares não flagelados e/ou coloniais, e caracteriza-se por apresentar somente reprodução assexuada por liberação de autósporos ou autocolônias (Krienitz *et al.*, 2001). Apesar de ser um grupo monofilético, Selenastraceae apresenta grande complexidade taxonômica (Treviño, 2008). Por apresentar baixa variabilidade fenotípica, as suas características morfológicas são insuficientes para discriminar as espécies.

Apesar da baixa variedade morfológica, a diversidade genotípica dessas espécies, ainda que não muito bem delimitada, pode ser suficiente para que produzam diferentes compostos, ou seja, carboidratos, lipídios e/ou proteínas que diferem quanto à sua composição. Contudo, muitos dos resultados obtidos com a biologia molecular, atualmente disponíveis, são ainda inconclusivos e não refletem as relações filogenéticas adequadamente (Krienitz *et al.*, 2001), mesmo com avaliação baseada em mais de um gene (poligênica), o que indica que essa metodologia ainda necessita de estudos para encontrar outros genes que possam ser mais efetivos (Garcia *et al.*, 2017).

Dessa forma, dados moleculares da composição química, em conjunto com dados genéticos e até mesmo morfológicos podem ser a chave para auxiliar no entendimento das relações filogenéticas desse grupo. Este uso de conjuntos de dados genotípicos, fenotípicos e filogenéticos é denominado como taxonomia polifásica (Vandamme *et al.*, 1996).

1.3. ESPECTROMETRIA DE MASSA POR MALDI-TOF

Espectrometria de massa é uma ferramenta indispensável para a análise de compostos em vários campos da ciência. Os diversos métodos que existem atualmente permitem a análise da composição de materiais desconhecidos, medicamentos, materiais artificiais e amostras biológicas ambientais ou de laboratório (Gross, 2011).

O pesquisador Koichi Tanaka recebeu o Prêmio Nobel de Química em 2002 por desenvolver um método de espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS). Esse método permite a análise de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas com uma baixa taxa de fragmentação (Lewis *et al.*, 2006).

A espectrometria de massa por MALDI é realizada em duas etapas. Primeiramente o material a ser analisado é misturado com a matriz, que consiste em uma solução de solventes saturada com pequenas moléculas orgânicas (Hoffmann, 1996). Essa mistura é então colocada em uma placa de metal que contém espaços, denominados *spots*, individuais para várias amostras. A secagem da mistura promove a retirada dos solventes, resultando em uma “solução sólida” (Hoffmann, 1996). Nesse processo ocorre a cristalização da matriz, que é fundamental para a segunda etapa, pois permite uma adequada absorção da energia do laser pela matriz e consequente dessorção da mistura e ionização das moléculas a serem analisadas (Gross, 2011).

As moléculas ionizadas são então aceleradas através de um tubo a vácuo. Essa energia inicialmente fornecida é igual para todas as moléculas. Assim relação massa carga de cada uma determina o tempo de voo através do tubo, sendo detectadas por um analisador por tempo de voo (TOF) (Lewis *et al.*, 2006).

Essa ferramenta se mostrou eficiente para a rápida identificação de diversos microrganismos como vírus (Calderaro *et al.*, 2014), fungos (Amiri-Eliasi & Fenselau, 2001), bactérias (Calderaro *et al.*, 2014; Sandrin *et al.*, 2013; Shih *et al.*, 2015; Starostin *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015), protozoários (Calderaro *et al.*, 2015) e microalgas (Barbano *et al.*, 2015; Emami *et al.*, 2015; Lee *et al.*, 2008; Murugaiyan *et al.*, 2012).

1.4. APLICAÇÃO DE MALDI-TOF MS PARA MICROALGAS

O uso da técnica de MALDI-TOF MS na identificação de microalgas é recente e o número de trabalhos relacionados ao tema ainda é pequeno. Uma pesquisa na base de dados PubMed com a palavra “MALDI”, em qualquer campo retorna, um total de 36912 trabalhos, no entanto ao pesquisar incluindo a palavra “microalgae”, também em qualquer campo, apenas 21 resultados são registrados, sendo que desses apenas quatro trabalhos abordam a utilização desta técnica na identificação de microalgas. Apesar de poucos estudos realizados com microalgas, até a presente data, os resultados são promissores.

Lee *et al.* (2008) estudaram a aplicação de MALDI-TOF MS como alternativa para a rápida identificação de dinoflagelados, grupo de importância ecológica por grandes proliferações nocivas devido às toxinas que produzem. Através da inspeção visual dos espectros, os autores identificaram diferentes padrões que permitiram distinguir as espécies de dinoflagelados em culturas isoladas e em misturas de diferentes espécies, possibilitando ainda a fácil distinção entre espécies intimamente relacionadas, como as pertencentes a um mesmo gênero.

Paz *et al.* (2011) analisaram o uso desta técnica para a determinação qualitativa de ficotoxinas presentes em espécies de microalgas marinhas. Obtiveram sucesso na detecção de compostos de massas superiores a 800 Da, e consideraram esse processo muito mais rápido, quando comparado aos processos atualmente utilizados, para a identificação dessas moléculas. No entanto, segundo os autores, existe ainda a necessidade de uma otimização do método para massas inferiores às estudadas.

Murugaiyan *et al.* (2012) empregaram a espectrometria de massa por MALDI-TOF na identificação de microalgas do gênero *Prototheca* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), um grupo infeccioso de microalgas aclorofiladas de complicada identificação clínica. Os espectros obtidos permitiram a distinção de seis espécies de *Prototheca* e duas espécies de *Chlorella* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae), permitindo inclusive uma distinção das cepas de mesma espécie, consistindo assim em uma alternativa rápida e prática em relação aos métodos atualmente utilizados, que consistem, por exemplo, em sequenciamento de 18S rDNA e PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Andrade *et al.* (2015) desenvolveram um estudo comparativo de diferentes matrizes e solventes para a análise de microalgas por MALDI-TOF MS. A partir de diferentes protocolos de preparação da amostra, para quatro espécies de microalgas, foram identificadas quais metodologias fornecem espectros com boa relação sinal/ruído, ou seja, espectros em que a intensidade de sinais é superior à intensidade de ruídos, para uma extensão de massas de 4000 a 20000 m/z.

O estudo realizado por Emami *et al.* (2015) destacou que a análise de espectros de massa obtidos por MALDI-TOF de 32 cepas de microalgas do gênero *Dunaliella* (Chlorophyta, Chlorophyceae) revelou uma capacidade de resolução taxonômica superior ao sequenciamento de ITS rDNA, diferenciando cepas que apresentaram sequenciamentos idênticos desse gene. Além disso, realizaram amostragens de 20 pontos da curva de crescimento de duas cepas, e identificaram não haver diferenças significativas nos espectros, havendo apenas algumas variações nas intensidades dos picos.

Lee *et al.* (2015) demonstraram o potencial desta técnica para a identificação e análises filogenéticas de oito microalgas através de espectros de proteínas obtidos por MALDI-TOF. No entanto o estudo ficou restrito somente à diferenciação de grupos taxonômicos superiores, como os níveis de Divisão, Classe e Ordem.

Barbano *et al.* (2015) realizaram a caracterização de diversas espécies de microalgas, sendo 12 cepas de água doce e 19 cepas marinhas, através da comparação de

espectros obtidos por MALDI-TOF e sequenciamento do gene 18S rDNA. Nesse estudo foi utilizada uma extensão de massas de 2000 a 20000 m/z, pois, segundo os autores, diversos picos abaixo de 4000 m/z aparentaram ser úteis à caracterização de múltiplas espécies. Assim, como no estudo realizado por Lee *et al.* (2015), os dados obtidos suportam a capacidade desta técnica quanto à distinção rápida e clara de várias espécies, incluindo análises de misturas de culturas. Esses resultados também condizem com os obtidos por Emami *et al.* (2015), que sugerem que esta técnica possui uma capacidade de resolução taxonômica maior do que métodos baseados em sequenciamento de poucos genes.

Nos estudos citados a caracterização das microalgas foi realizada através da comparação de cepas e/ou espécies de mesmo gênero, à exceção de Lee *et al.* (2015), que trabalhou com organismos de ordens distintas. No entanto, nenhum estudo realizou a caracterização de microalgas pertencentes à família Selenastraceae, nem abordou as relações taxonômicas de espécies dentro desse nível.

2. OBJETIVOS

O presente estudo pretendeu investigar a aplicação dos espectros de massa obtidos por MALDI-TOF das células quanto da matéria orgânica dissolvida (MOD) excretada, tanto em massas baixas (400 - 2000 Da) quanto em massas altas (2000 - 20000 Da), como forma de auxiliar na elucidação das relações taxonômicas das espécies da família Selenastraceae.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CEPAS

Foram selecionadas 18 cepas, de 12 espécies diferentes, que são mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce – UFSCar (CCMA-UFSCar WDCM 853) em condições axênicas (Tabela 1). Todas as espécies utilizadas neste trabalho foram identificadas com base em sua morfologia de acordo com Garcia *et al.* (2017).

Da família Selenastraceae foram selecionadas 12 cepas de seis espécies. Como *outgroups* foram selecionados organismos de outra família (Scenedesmaceae) pertencente à mesma ordem (Sphaeropleales), organismos de outra classe (Trebouxiophyceae) pertencente à mesma divisão (Chlorophyta) e organismos de outra divisão (Heterokontophyta, Xanthophyceae e Bacillariophyceae).

3.2. CULTIVOS

Cultivos realizados em Erlenmeyers de 125 mL com 75 mL de meio WC (Guillard & Lorenzen, 1972) foram utilizados como fonte de células axênicas para as culturas utilizadas na determinação das curvas de crescimento. Todo manuseio foi realizado em condições axênicas utilizando fluxo laminar e esterilização com luz ultravioleta. Testes com meio de cultura (meio WC com peptona $250 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ e glicose $250 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$) e observações ao microscópio óptico para a verificação das condições axênicas foram efetuados semanalmente. Para padronizar o número inicial de células dos cultivos foram feitas contagens em microscópio óptico (Leica DME) utilizando o hemocitômetro de Fuchs-Rosenthal, de modo a obter uma concentração aproximada de $4 \times 10^4 \text{ células} \times \text{mL}^{-1}$. Cada microalga foi inoculada em um frasco Boeco® com capacidade de dois litros, contendo 900 mL de meio WC autoclavado, sem *buffer* e pH 7,0. Após homogeneização, o meio foi dividido em seis partes de 150 mL em frascos Boeco® autoclavados com capacidade de 250 mL. Os cultivos foram mantidos sob condições controladas de laboratório: fotoperíodo de 12:12 horas com intensidade luminosa de $200 \mu\text{mol}_{\text{fótons}} \times \text{m}^{-2} \times \text{s}^{-1}$ e temperatura de $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$. Todos os cultivos foram agitados diariamente.

Dos seis frascos de cada cultivo, três foram utilizados para amostragens de parâmetros de crescimento (absorbância), e os outros três frascos para análises em MALDI-TOF MS.

Tabela 1. Microalgas mantidas na Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce – UFSCar (CCMA-UFSCar WDCM 853) utilizadas na amostragem em MALDI-TOF MS. As cepas em destaque não são pertencentes à família Selenastraceae.

Espécie	Descrição	Cepa	Local de Isolamento	Ano	GPS
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>	Corda ex Korshikov 1953	CB2009/30	Nakuru - Quênia	2009	0°20'39.6"S 36°11'02.5"E
		333	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Monoraphidium contortum</i>	(Thuret) Komárková-Legnerová 1969	306	São Paulo - SP	2010	23°44'04.3"S 46°45'44.4"W
		329	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
		CB2012/33	Vinje - Noruega	2012	59°45'58.8"N 7°22'33.5"E
<i>Monoraphidium indicum</i>	Hindak 1977	549	Piracicaba - SP	2012	22°04'56.2"S 48°29'20.0"W
<i>Monoraphidium pseudobraunii</i>	(Belcher & Swale) Heynig 1979	325	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Selenastrum bibraianum</i>	Reinsch 1866	334	Corumbá - MS	2011	19°01'27.0"S 55°55'28.0"W
		602	Pitangueiras - SP	2013	21°02'52.5"S 48°14'45.7"W
		CB2009/36	Neuglobsow - Alemanha	2009	53°08'37.9"N 13°01'07.3"E
		047*	São Carlos - SP	2008	21°59'08.5"S 47°52'50.6"W
<i>Chlorolobion braunii</i>	(Nägeli) Komárek 1979	455	Anafândia - SP	2012	22°05'05.3"S 47°44'47.0"W
		137	Luiz Antônio - SP	1992	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Coelastrum sphaericum</i>	Nägeli, 1849	060	São Carlos - SP	1986	21°59'09.7"S 47°52'35.3"W
<i>Harioitina reticulata</i>	Dangeard 1889	326	Porto Velho - RO	2011	8°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Nephrocycium lunatum</i>	West 1892	065	Luiz Antônio - SP	1987	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Dictyosphaerium</i> sp.	Nägeli 1849	663	Icém - SP	2014	20°20'59.7"S 49°10'35.5"W
<i>Ophiocytium</i> sp.	Nägeli 1849	553	Jaboticabal - SP	2012	21°07'41.7"S 48°13'19.1"W
<i>Cyclotella</i> sp.	(Kützing) Brébisson 1838	BB041	Barra Bonita - SP	2002	22°31'47.2"S 48°31'43.9"W

* A cepa 047 foi utilizada somente em um teste de variação da matéria orgânica dissolvida e, portanto, não aparece nos clusters feitos neste trabalho.

3.3. CURVAS DE CRESCIMENTO

A caracterização da curva de crescimento de cada cepa é importante para determinar um período de amostragem padronizado para todas elas, uma vez que possuem taxas de crescimento diferentes entre si. Dessa forma a densidade óptica (ou absorbância) foi utilizada como parâmetro para a determinação das curvas de crescimento.

As amostragens foram diárias nos três primeiros dias de cultivo e depois os intervalos variaram entre três e quatro dias, durante um período de 32 dias. As medidas foram realizadas em réplicas usando um espectrofotômetro HACH DR 5000®, sendo leituras em duas absorbâncias, 680 nm e 750 nm, que representam, respectivamente, espectros de maior e de menor absorção pelos pigmentos (Griffiths *et al.*, 2011). A partir da diferença entre essas medidas e com a média das réplicas, as curvas foram plotadas com o programa OriginPro 8.

Para determinar e padronizar a fase de crescimento das culturas a serem analisadas por MALDI-TOF MS, alíquotas de 4 mL foram retiradas para leituras de absorbância, seguindo o mesmo procedimento utilizado para a determinação das curvas de crescimento.

3.4. PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

3.4.1. MATRIZES E MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

Devido ao fato de existirem poucos trabalhos na literatura que realizaram análises de espectrometria de massas por MALDI-TOF com microalgas, e que dados desse tipo para Selenastraceae são praticamente inexistentes, foram necessários testes preliminares e a partir deles é que foram definidos, de acordo com a qualidade dos espectros obtidos, a matriz e o método de amostragem a serem utilizados neste estudo. Assim foram obtidos espectros de duas cepas (333 – *A. fusiformis* e 060 – *C. sphaericum*) com o uso de quatro matrizes: ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) e ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA ou CCA). Essas matrizes são derivadas do ácido cinâmico. Beavis & Chait (1989) propuseram esse grupo de compostos como matrizes para análise de proteínas. Contudo os espectros obtidos para amostras biológicas podem apresentar picos que representam outros tipos de biomoléculas. As matrizes foram preparadas em uma concentração de $20 \text{ mg} \times \text{mL}^{-1}$, utilizando como solvente ácido trifluoroacético (TFA) e acetonitrila (ACN) na proporção de 50:50 v/v (Andrade *et al.*, 2015).

Com essas matrizes foram feitos três métodos de amostragem: método *dried-droplet*, método sanduíche e suspensão em matriz (Dai *et al.*, 1999). O primeiro método (*dried-droplet*) consiste em colocar uma pequena quantidade de amostra (2 µL) na placa alvo de aço (*ground steel*) para MALDI (modelo MTP 384, Bruker Daltonics®) e deixar secar à temperatura ambiente. Com a amostra seca coloca-se então 2 µL de matriz por cima da amostra e novamente a placa é seca em temperatura ambiente. No segundo método (sanduíche) adiciona-se 2 µL de matriz na placa, e após secar em temperatura ambiente, segue-se o mesmo procedimento do método anterior. No terceiro método a amostra é misturada diretamente com matriz, em uma quantidade suficiente para ressuspender o material, e colocada no sonicador Unique®. Após a homogeneização coloca-se 2 µL da mistura na placa e a secagem é feita em temperatura ambiente. Foram feitas trélicas de amostragem para cada réplica de cultivo em todos os testes.

A partir dos resultados desses testes foi possível determinar que a matriz que rendeu espectros de melhor qualidade foi o ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) e o melhor método foi a suspensão em matriz. Todos os espectros deste trabalho foram obtidos com um aparelho MALDI-TOF MS autoflex (Bruker Daltonics®).

3.4.2. CÉLULAS

As culturas foram centrifugadas em tubos do tipo Falcon de 15 mL em centrífuga Heraeus Megafuge® 2.0 a $2570 \times g$ durante 12 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* algal foi congelado em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a data das análises. Antes das análises as amostras foram transferidas para tubos Eppendorf e congeladas novamente em nitrogênio líquido para a liofilização (Heto Drywinner). Em cada tubo, o *pellet* algal foi liofilizado, e foi realizada a suspensão em matriz, colocando no sonicador (Unique®) por aproximadamente 3 minutos, tempo suficiente para desfazer qualquer aglomerado de células visível, não havendo a necessidade de desintegrar as células.

3.4.3. MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD)

Foram filtrados 14 mL do cultivo em filtro (Sartorius) de fibra de vidro com poros de 0,6 µm, para a análise da MOD, com posterior congelamento em tubos do tipo Falcon de 15 mL em freezer a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a data de disponibilidade do equipamento. Antes das análises foi realizada uma concentração do material através da extração de fase sólida em colunas EASY CHROMABOND®.

As colunas foram condicionadas com 1 mL de água Milli-Q, 3 mL de metanol e mais 1 mL de água Milli-Q. As amostras de 14 mL foram então filtradas, nas colunas, para a retenção da matéria orgânica. A eluição foi realizada com o uso de 3 mL de acetona e armazenamento em *vials* de vidro. Os materiais foram, então, secos em estufa (SalvisLab®) à 50 °C por 48 horas, fechados e vedados com Parafilm®.

Houve uma alteração do solvente da matriz para as análises da MOD devido ao fato da indisponibilidade de ACN no laboratório. Assim foi utilizada uma mistura de metanol com TFA na proporção de 50:50 v/v como solvente. Dessa forma foi realizada em cada *vial* a suspensão em matriz, colocando no sonicador (Unique®) por aproximadamente 3 minutos, para a homogeneização da amostra.

3.4.4. IDADE DO CULTIVO E VARIAÇÃO DA MOD

Foi realizado um teste com três cepas (047 – *S. bibrainum*, CB2012/33 – *M. contortum* e 333 – *A. fusiformis*) para obtenção de espectros de massa da MOD, em massas baixas e massas altas, em diferentes fases de crescimento. Foram feitas amostragens com 4, 11, 17, 25 e 32 dias de cultivo para cada uma dessas cepas. As condições de cultivo e o protocolo de preparação das amostras de MOD foi o mesmo utilizado para as outras cepas deste trabalho. No entanto não foram feitas réplicas de cultivo, pois foi apenas um teste preliminar para trabalhos posteriores com matéria orgânica dissolvida (MOD) excretada.

3.5. AQUISIÇÃO DE ESPECTROS

A calibração do equipamento foi realizada com *Protein Calibration Standard I* (Insulina [M+H]⁺, Ubiquitina I [M+H]⁺, Citocromo C [M+H]⁺, Mioglobina [M+H]⁺, Citocromo C [M+2H]²⁺, Mioglobina [M+2H]²⁺) comprado da Bruker Daltonics®, em uma extensão de massas de 2 a 20 kDa. O equipamento de MALDI-TOF MS foi configurado utilizando o *software* FlexControl (Bruker Daltonics®).

Foram obtidos espectros em duas extensões de massas: massas baixas (de 400 a 2000 Da); e massas altas (de 2 a 20 kDa) com o aparelho operando em modo de ionização linear positiva. Os íons foram gerados com um laser Smartbeam™ na frequência de 200 Hz, PIE (do inglês *Pulsed Ion Extraction*) de 120 ns e voltagem de lentes de 2,60 kV. A voltagem das fontes de íons foi de 5,99 kV na primeira fonte de íons e 5,23 kV na segunda.

Os espectros foram gerados, em trélicas de amostragem, com uma média de 10000 disparos do laser, com a potência variando entre 70% e 90%. Para o tratamento dos espectros foi utilizado o *software* FlexAnalysis (Bruker Daltonics®).

3.6. ANÁLISES DE AGRUPAMENTO

As análises de agrupamento (*cluster*) foram realizadas com o *software* Bionumerics 7.6 (Applied Maths®). A partir dos espectros das réplicas de amostragem foram obtidos os espectros médios, para as réplicas de cultivo, utilizando um filtro de 94% de similaridade entre os espectros. Para obter espectros médios referentes às cepas foi utilizado um filtro de similaridade de 80%. O uso de um filtro de similaridade mais brando para compor o espectro médio para cada cepa se justifica pelo fato de serem réplicas experimentais, havendo assim uma maior variabilidade.

Os clusters foram feitos apenas com as cepas que apresentaram espectros com boa relação sinal ruído. A partir de teste interativos foram determinados os métodos que permitiram um melhor agrupamento das cepas. Assim para os espectros, obtidos com células, de massas altas (2 - 20 kDa) foi feita uma análise de dissimilaridade dos picos com correlação de Pearson e método de *Neighbor Joining*. Para os espectros de massas baixas (400 - 2000 Da) foi realizada uma análise de dissimilaridade das curvas com correlação de Pearson e método de *single linkage*. Para os espectros de massas altas da MOD foi feita uma análise de dissimilaridade da curva com correlação de Pearson e método de pareamento de grupos não ponderado usando médias (UPGMA - *Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages*) e os espectros de massas baixas não permitiram a realização de clusters. A qualidade dos ramos de todos os clusters foi definida por correlação cofenética.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. CURVAS DE CRESCIMENTO

Os cultivos foram acompanhados por um período suficiente para que atingissem a fase estacionária, sendo que alguns chegaram a senescência. Todas as cepas atingiram a metade da fase exponencial com, aproximadamente, 10 dias de cultivo. Assim, o valor da absorbância obtido para este dia, foi utilizado para a padronização da amostragem na obtenção dos espectros no MALDI-TOF. A figura 1 mostra as curvas de crescimento, realizadas com a média das réplicas, de cada uma das cepas utilizadas.

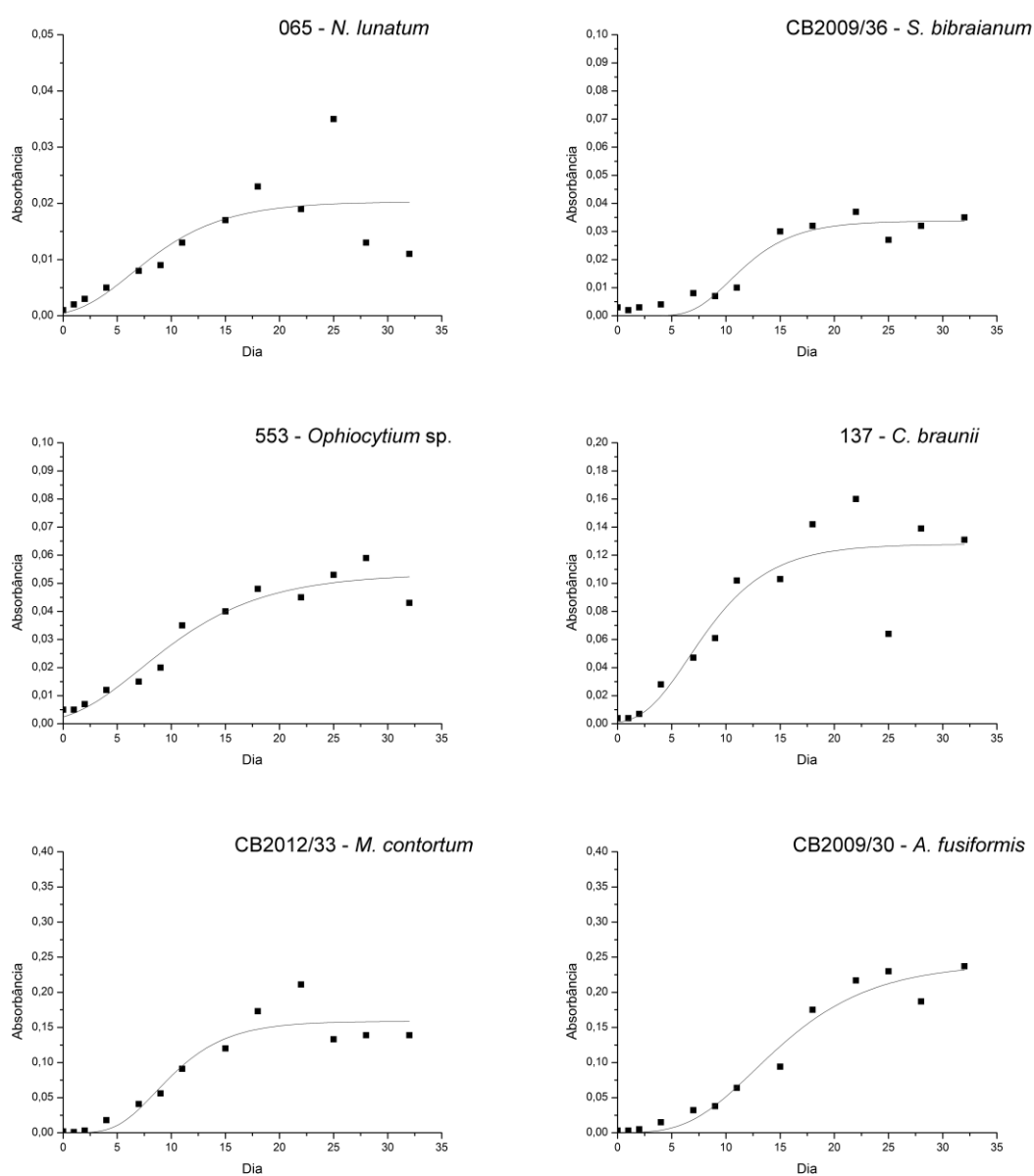


Figura 1. (Continua)

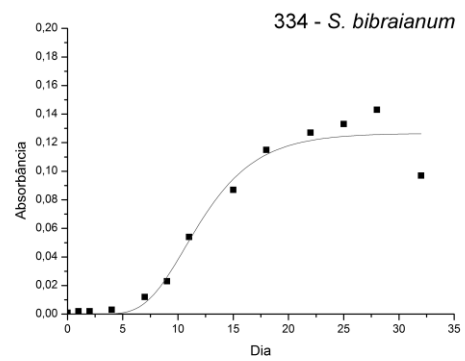
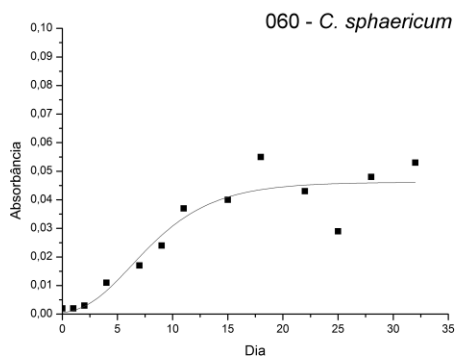
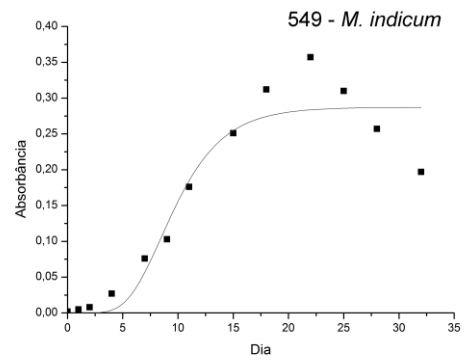
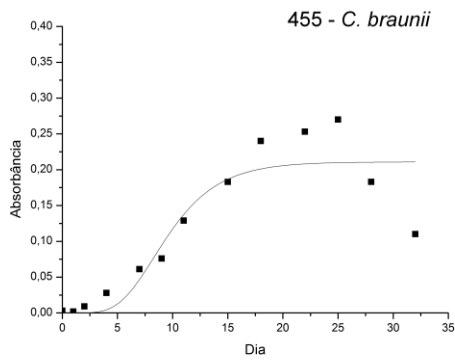
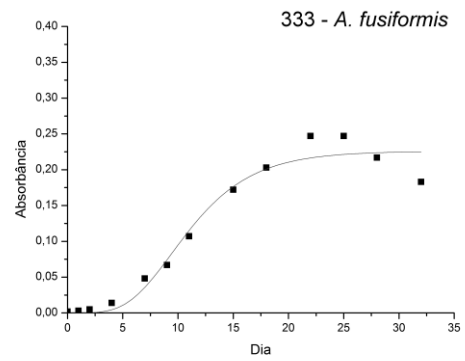
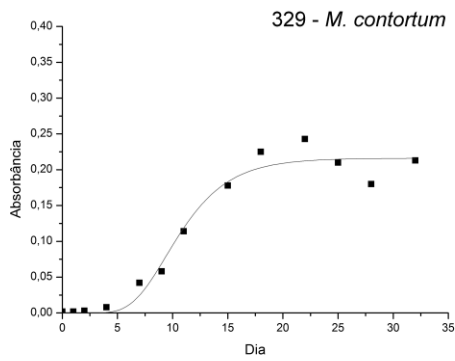
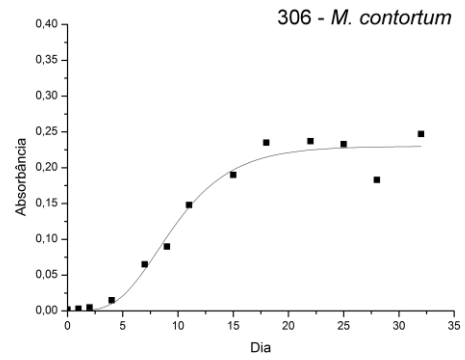
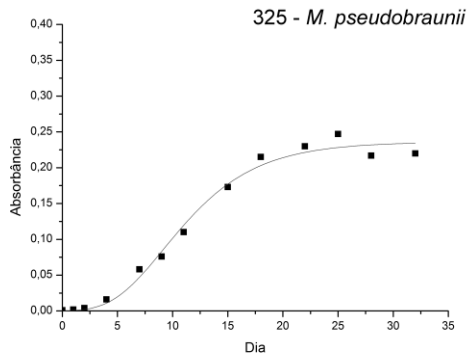


Figura 1. (Continua)

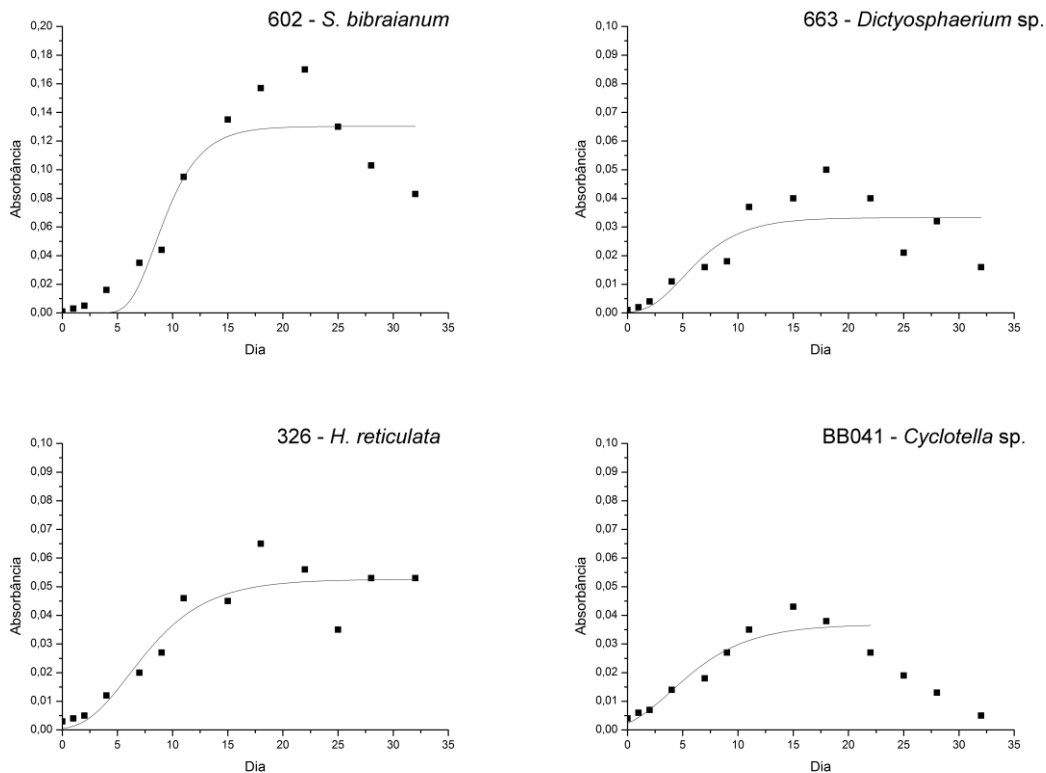


Figura 1. Curvas de crescimento obtidas pela diferença entre as absorbâncias em 680 nm e 750 nm das cepas utilizadas. Números referem-se ao código de cada espécie no banco CCMA-UFSCar.

As condições ambientais foram padronizadas para todos os cultivos, no entanto as curvas variaram mesmo entre cepas de uma mesma espécie, como pode ser observado, por exemplo, com as cepas 137 e 455 (*C. braunii*). A cepa 455 apresentou uma absorbância consideravelmente maior do que a cepa 137. Também houve variação entre as cepas 333 e CB2009/30 (*A. fusiformis*), sendo que enquanto a cepa 333 apresentou uma queda no crescimento ao final do período a outra ainda estava na fase estacionária. No crescimento das cepas CB2009/36, 334 e 602 (*S. bibrainum*) houve menor registro de absorbância na cepa CB2009/36 em relação às demais, e ao final do período observado esta cepa ainda estava em fase estacionária, enquanto as outras estavam no início da senescência. Já as cepas CB2012/33, 306 e 329 (*M. contortum*) apresentaram curvas crescimento muito semelhantes entre si.

A cepa utilizada de *Cyclotella* sp. (BB041) apresentou uma curva de crescimento que está de acordo com observações anteriores realizadas em laboratório, para cultivos de diatomáceas, em que não ocorre uma fase estacionária. Dessa forma a curva ajustada desconsiderou a fase de senescência, pois considerar essa fase tornava o ajuste uma linha reta, o que não permitia a inferência do tamanho da fase exponencial.

4.2. QUALIDADE DOS ESPECTROS

A obtenção de espectros depende de uma série de fatores. A matriz deve interagir com as moléculas da amostra para permitir a ionização sem promover a fragmentação. O processo de cristalização é importante para permitir uma absorção adequada da energia do laser. A deposição homogênea da amostra juntamente com a matriz na placa é importante para a correta aquisição da relação massa/carga dos compostos (Gross, 2011).

Falhas que ocorrem nesses fatores podem levar à não obtenção de um espectro ou à obtenção de um espectro de baixa qualidade, ou seja, os sinais observados são oriundos de ruídos. A Figura 2 representa uma comparação entre espectros, sem nenhum tratamento, de baixa qualidade (somente ruídos), de qualidade intermediária (algum ruído, porém com boa intensidade de sinais) e de boa qualidade (baixa quantidade de ruídos). A Figura 3 representa os mesmos espectros após a subtração da linha de base, evidenciando assim a interferência dos ruídos nos espectros.

Dessa forma as análises de clusters foram realizadas somente com as cepas que renderam espectros em que houve picos com intensidade superior aos ruídos. A qualidade dos espectros de cada cepa variou de acordo com os experimentos. Com a cepa 326 (*H. reticulata*), por exemplo, não foi possível a obtenção de espectros de massas altas, no entanto foi possível para massas baixas e para MOD (Figura 4).

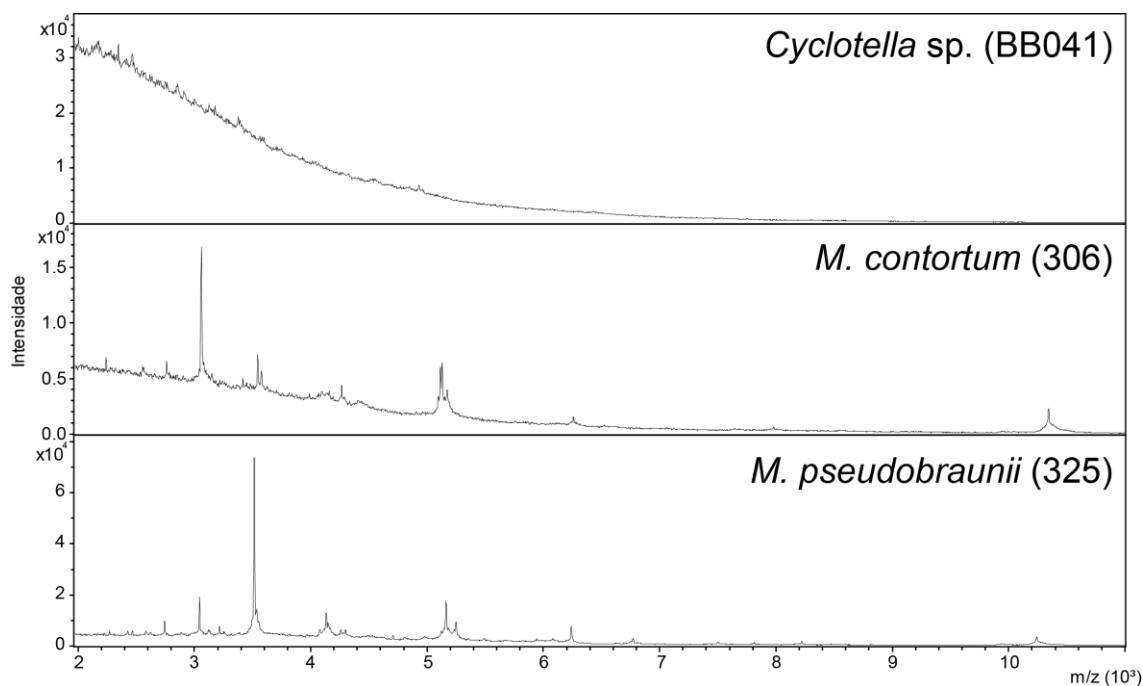


Figura 2. Comparação entre espectros de massas altas obtidos para três cepas. O eixo horizontal representa a relação massa carga das moléculas analisadas e os eixos verticais representam a intensidade do sinal

detectado pelo detector TOF. Os espectros foram cortados em 11 kDa devido à ausência de picos posteriores.

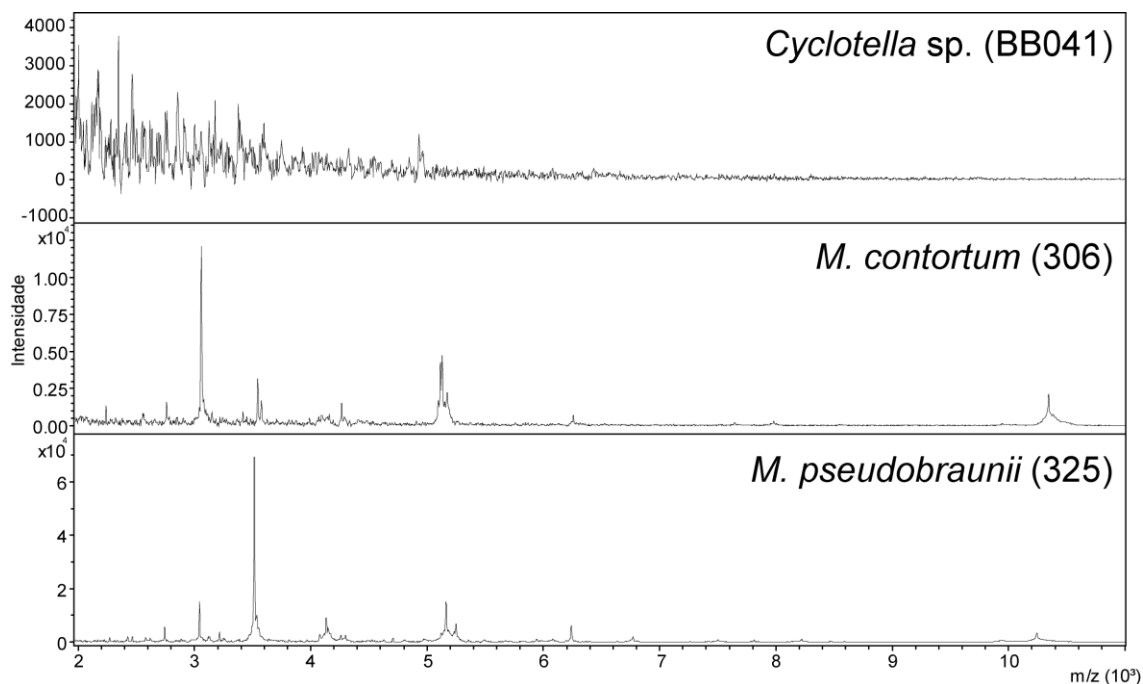


Figura 3. Comparação entre espectros de massas altas obtidos para três cepas após a subtração da linha de base. Os espectros foram cortados em 11 kDa devido à ausência de picos posteriores.

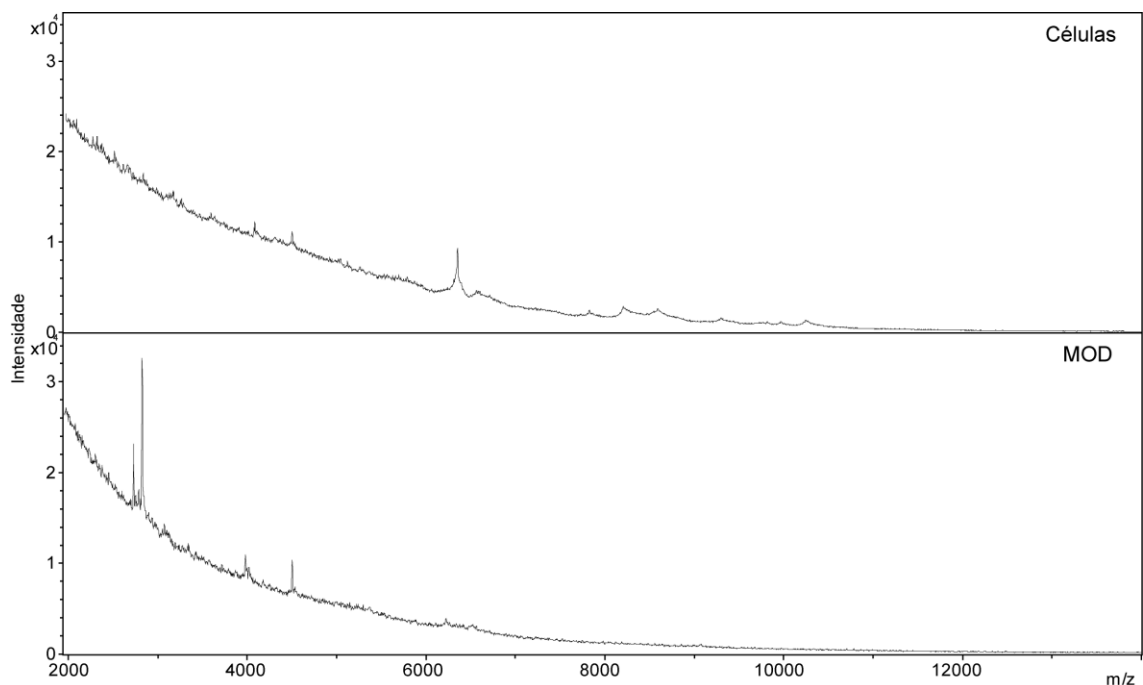


Figura 4. Comparação entre espectros de massas altas obtidos com células e com matéria orgânica dissolvida (MOD) para a cepa 326 (*H. reticulata*). A baixa intensidade de sinais no espectro de células impossibilitou a utilização dessa cepa. Os espectros foram cortados em 14 kDa por não haver picos posteriores.

4.3. MATRIZES E MÉTODOS DE AMOSTRAGEM

Tanto as matrizes quanto os métodos de amostragem influenciaram na obtenção dos espectros. Houve variação dos picos e da intensidade dos mesmos, assim como da relação sinal ruído, para as duas cepas testadas. As figuras 5 e 6 representam as variações dos espectros de massas baixas, sem tratamento, para as cepas 060 (*C. sphaericum*) e 333 (*A. fusiformis*), respectivamente. O aumento de intensidade que aparece em todos os espectros pouco antes de 1400 Da é possivelmente um problema de aquisição do equipamento. Somente com o tratamento C (Ácido Cafeico - suspensão em matriz) da cepa 060 não foi possível a obtenção de espectro.

Os espectros de massas altas obtidos com as diferentes matrizes e métodos de amostragem para as cepas 060 (*C. sphaericum*) e 333 (*A. fusiformis*) estão representados nas figuras 7 e 8, respectivamente. As massas acima de 12 kDa foram omitidas por não haver nenhum pico aparente. Não foram obtidos espectros para a cepa 060 com os tratamentos G (Ácido Ferúlico - *dried-droplet*) e I (Ácido Ferúlico - suspensão em matriz).

Diferentes matrizes interagem com diferentes moléculas da amostra, havendo assim uma variação dos picos e das intensidades nos espectros obtidos. Além disso o método de amostragem influencia no processo de cristalização da matriz, afetando a absorção da energia emitida pelo laser e, conseqüentemente, a ionização das moléculas presentes na amostra. Quanto maior a intensidade dos picos, e menor for a relação do sinal/ruído, melhor será a qualidade do espectro. Dessa forma os espectros de melhor qualidade obtidos nesse teste foram com a utilização da matriz HCCA. Como para essa matriz a variação entre os métodos de amostragem foi baixa optou-se por utilizar o método mais prático, que foi a suspensão em matriz.

A reprodutibilidade dos espectros de massa é fundamental para a caracterização de uma cepa ou espécie de modo adequado. A técnica selecionada para o presente estudo permitiu a obtenção de espectros com uma similaridade superior a 80% para as réplicas experimentais. Dessa forma a utilização dessa técnica com células inteiras é uma forma viável de obtenção de espectros reprodutíveis, com a vantagem de exigir pouco tempo e trabalho na preparação das amostras. Além disso também é vantajosa quanto à quantidade de material necessário para as análises. Amostras de 15 mL retiradas de cultivos de 150 mL forneceram células, após um período de 10 dias, suficientes para a obtenção de espectros.

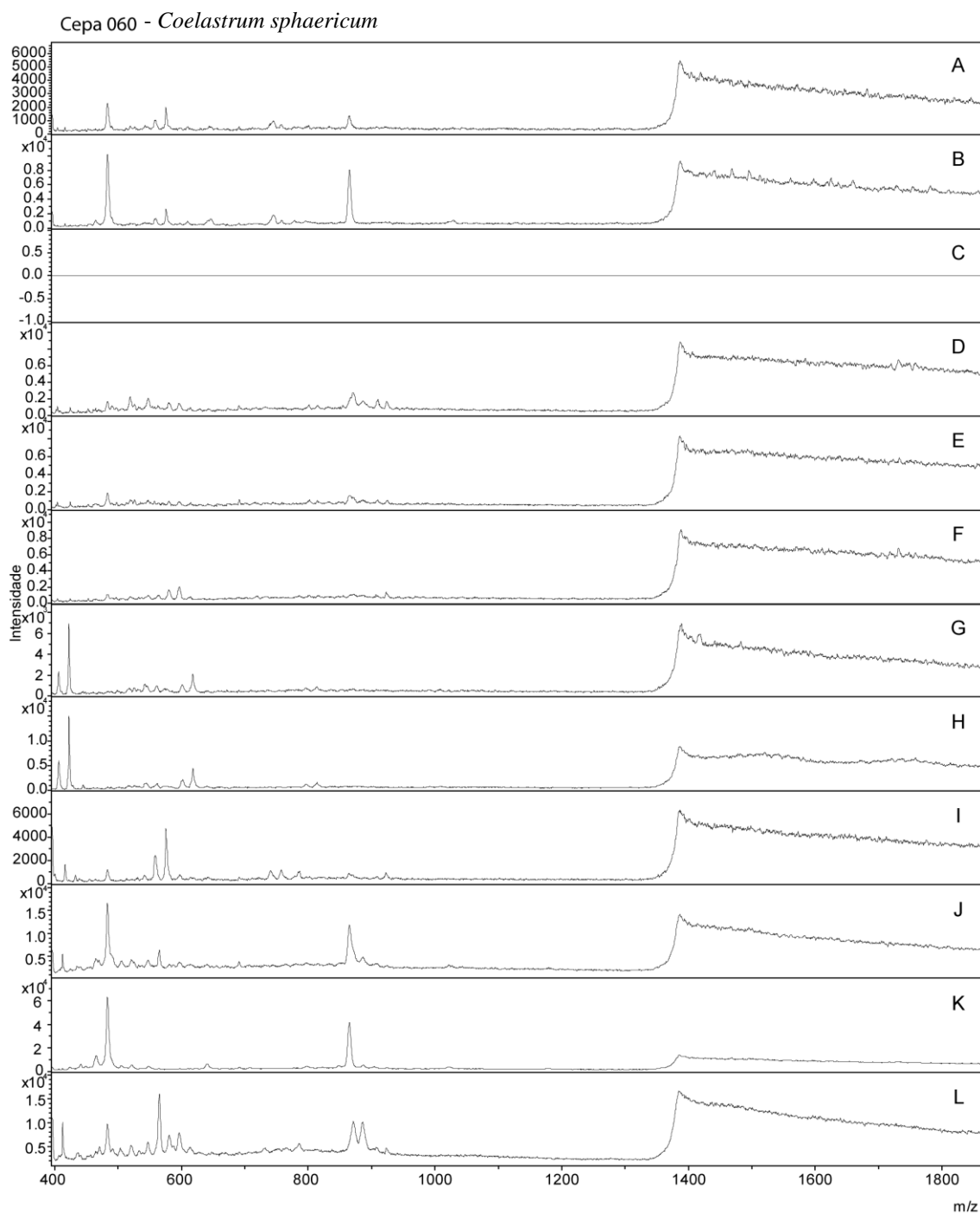


Figura 5. Espectros de massas baixas obtidos para a cepa 060 (*C. sphaericum*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.

Cepa 333 - *Ankistrodesmus fusiformis*

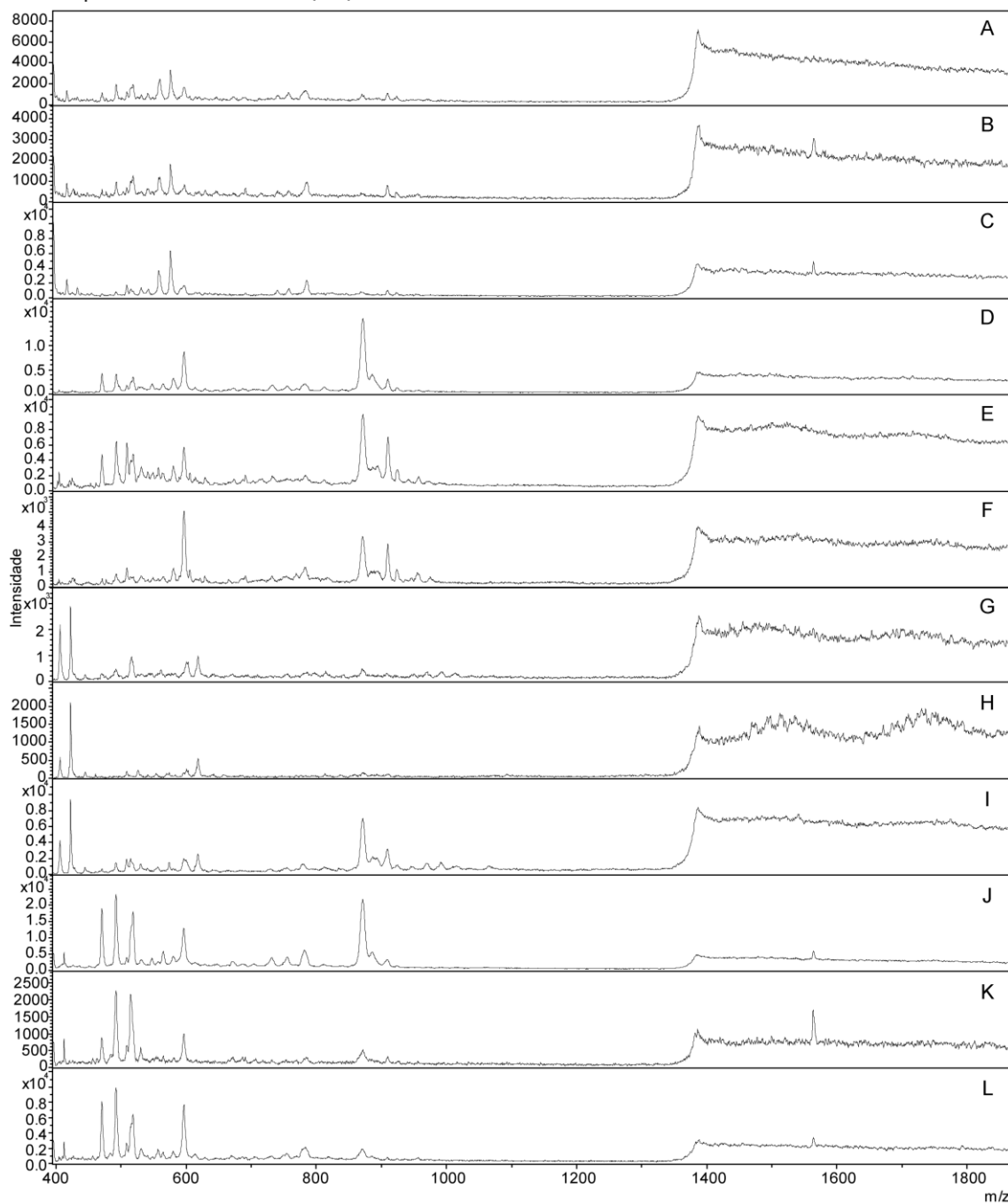


Figura 6. Espectros de massas baixas obtidos para a cepa 333 (*A. fusiformis*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.

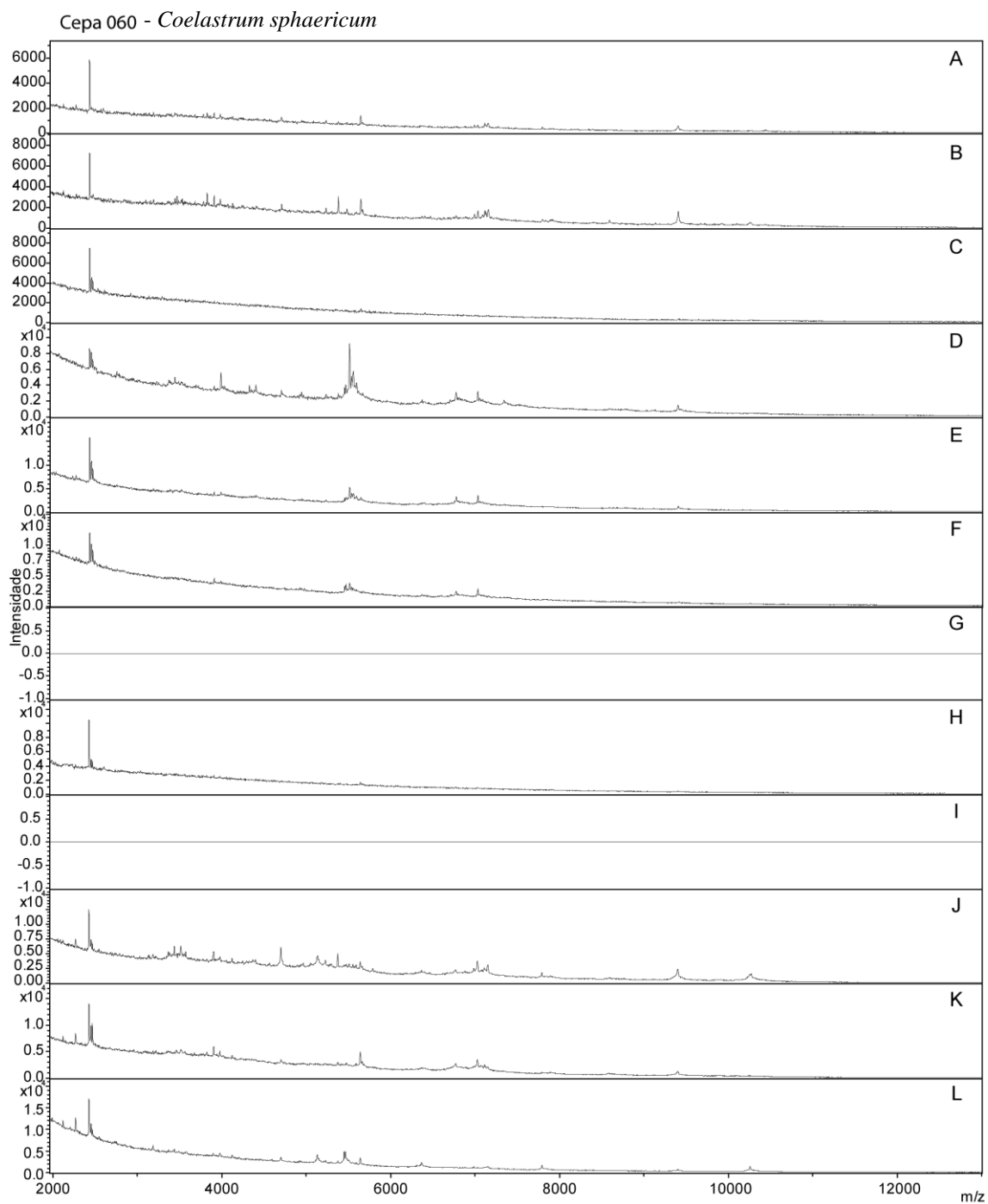


Figura 7. Espectros de massas altas obtidos para a cepa 060 (*C. sphaericum*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.

Cepa 333 - *Ankistrodesmus fusiformis*

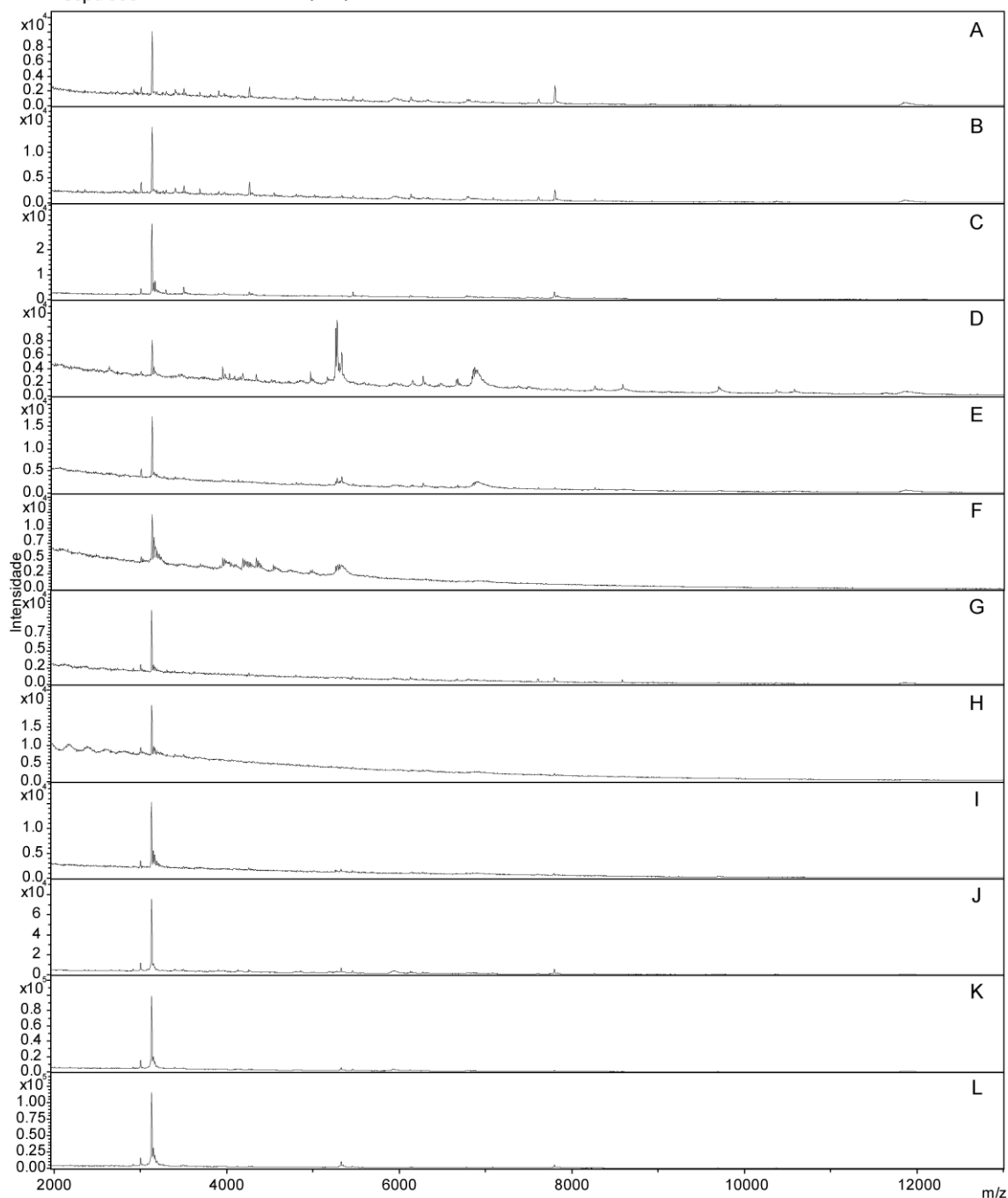


Figura 8. Espectros de massas altas obtidos para a cepa 333 (*A. fusiformis*) com quatro diferentes matrizes e três diferentes métodos de amostragem. (A) Ácido Cafeico - *dried-droplet*; (B) Ácido Cafeico - sanduíche; (C) Ácido Cafeico - suspensão em matriz; (D) DHB - *dried-droplet*; (E) DHB - sanduíche; (F) DHB - suspensão em matriz; (G) Ácido Ferúlico - *dried-droplet*; (H) Ácido Ferúlico - sanduíche; (I) Ácido Ferúlico - suspensão em matriz; (J) HCCA - *dried-droplet*; (K) HCCA - sanduíche; (L) HCCA - suspensão em matriz.

4.4. CÉLULAS

4.4.1. MASSAS BAIXAS (400 – 2000 DA)

A obtenção de espectro de massas baixas foi possível para todas as cepas, permitindo assim a elaboração de um cluster com 18 cepas. A Figura 9 representa o cluster com base nos espectros das réplicas de cultivo.

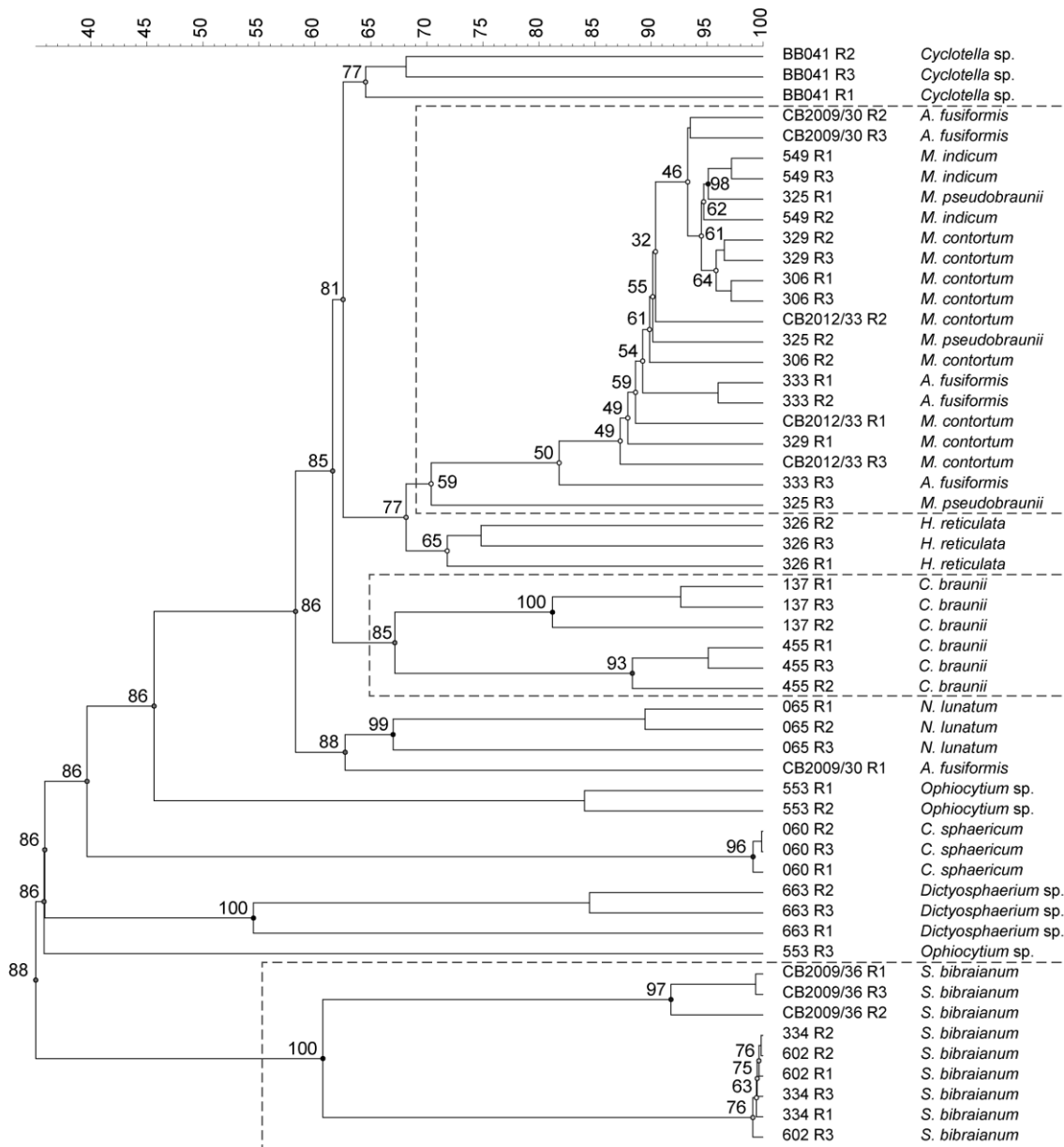


Figura 9. Cluster baseado nos espectros de massas baixas (400 - 2000 Da) das células das réplicas de cultivo.

Os espectros de massas baixas foram bastante reprodutivos para algumas cepas, permitindo a diferenciação dessas das demais, como por exemplo, as cepas 060 (*C. sphaericum*) e 326 (*H. reticulata*). Além disso também foi possível o agrupamento de

cepas de uma mesma espécie como as cepas 137 e 455 (*C. braunii*). As cepas 334, 602 e CB2009/36 (*S. bibraianum*) também foram agrupadas, havendo grande semelhança entre as cepas 334 e 602 e uma separação considerável em relação à cepa CB2009/36. Essa diferença entre essas cepas pode ser devido ao isolamento geográfico, uma vez que a cepa mais distante é proveniente de outro continente (Europa) enquanto as outras duas são do mesmo país (Brasil) (Rysanek *et al.*, 2015). As cepas de *A. fusiformis* e do gênero *Monoraphidium* ficaram agrupadas em um mesmo clado, devido à grande semelhança entre as curvas dos espectros dessas cepas. Esse resultado condiz com o trabalho baseado em biologia molecular de Garcia *et al.* (2017), que conclui que a classificação taxonômica das espécies dos gêneros *Monoraphidium* e *Ankistrodesmus* ainda é incerta. Isso indica que esses grupos são possivelmente polifiléticos. Apenas uma réplica da cepa CB2009/30 (*A. fusiformis*) ficou separada das demais citadas anteriormente.

A Figura 10 representa um cluster elaborado com base nos espectros médios de cada cepa e a matriz de similaridade dos espectros. É possível observar a grande similaridade dos espectros das cepas de *A. fusiformis* e do gênero *Monoraphidium*, e por esse motivo essas cepas ficam todas agrupadas em um mesmo clado. As cepas de *C. braunii* e *S. bibraianum* continuam agrupadas, assim como no cluster baseado nas réplicas.

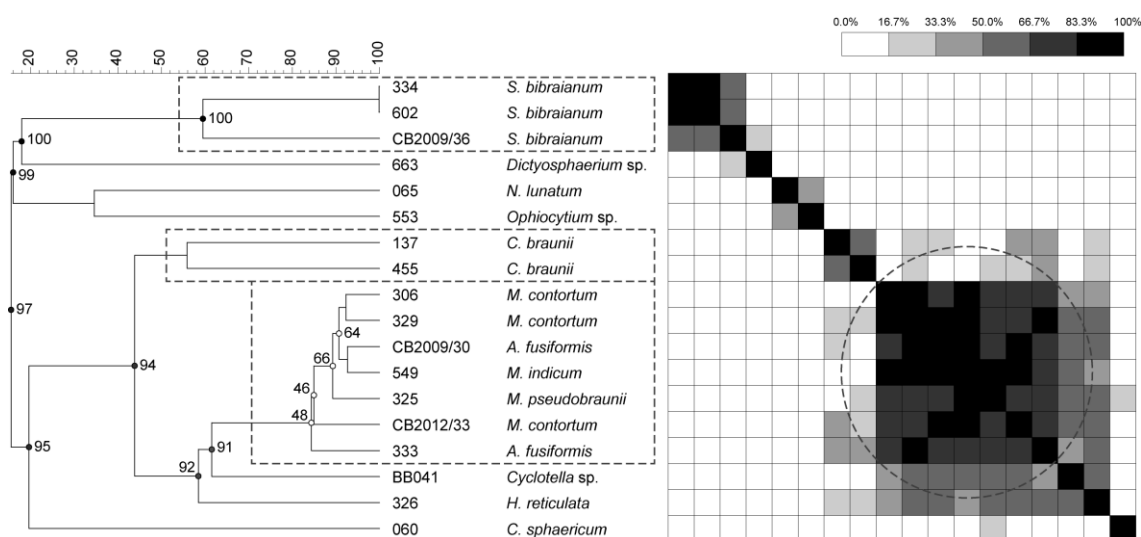


Figura 10. Cluster baseado nos espectros médios de massas baixas (400 - 2000 Da) das células das cepas.

4.4.2. MASSAS ALTAS (2000 – 20000 DA)

A obtenção dos espectros de massas altas não foi possível para as cepas *Cyclotella* sp. e 326 (*H. reticulata*). O agrupamento representado na Figura 11 foi realizado, portanto, com os espectros das réplicas de cultivo de 16 cepas. A matriz de similaridade

ao lado do cluster evidencia a alta reprodutibilidade dos espectros das réplicas. Assim houve o agrupamento das réplicas das cepas analisadas, exceto no caso da cepa 065 (*N. lunatum*) em que uma das réplicas (R3) ficou em um ramo separado das outras. Essa separação pode ser explicada por uma diferença na porção inicial dos espectros (Figura 13). Essa parte do espectro, com vários picos sucessivos, é característica de polímeros (Hillenkamp *et al.*, 1991). Características das células deste cultivo ou erros metodológicos, como problemas na homogeneização da mistura ou cristalização inadequada, podem ter provocado essa baixa intensidade dos picos.

Quatro cepas do gênero *Monoraphidium* ficaram agrupadas, sendo que as cepas 306 e 329 (*M. contortum*) ficaram agrupadas em um mesmo clado, enquanto outra cepa dessa mesma espécie (CB2012/33) ficou agrupada com a cepa 325 (*M. pseudobraunii*). A cepa 549 (*M. indicum*), apesar de pertencer ao mesmo gênero, não agrupou com as demais. Estudos recentes (Garcia *et al.*, 2017) indicam que esse gênero não seria monofilético e, portanto, a classificação atual destes organismos pode estar incorreta.

As cepas da espécie *S. bibraianum* (334, 602 e CB2009/36) ficaram agrupadas em um mesmo clado, mantendo a mesma separação observada no cluster obtido com massas baixas, em que a cepa CB2009/36 fica isolada das outras duas. Novamente refletindo um possível isolamento geográfico dessas cepas.

Assim como com os espectros de massas baixas as cepas 137 e 455 (*C. braunii*) também foram agrupadas. No entanto, e as cepas 333 e CB2009/30 (*A. fusiformis*) que foram agrupadas com as do gênero *Monoraphidium* na análise anterior, ficaram agora agrupadas em um clado distinto.

Apesar do agrupamento em cladogramas distintos a matriz de similaridade (Figura 11) mostra que entre os espectros das cepas 333 (*A. fusiformis*) e CB2009/33 (*M. contortum*) há uma similaridade considerável. Além disso a cepa CB2009/33 também apresentou uma similaridade com as cepas 602 e 334 (*S. bibraianum*). A cepa 549 (*M. indicum*) também apresenta similaridade com a cepa 329 (*M. contortum*), que pertence ao mesmo gênero.

Essas similaridades podem ser um indício de que algumas regiões do espectro podem ser mais significativas para o agrupamento dessas cepas em um mesmo clado, uma vez que todas pertencem à família Selenastraceae.

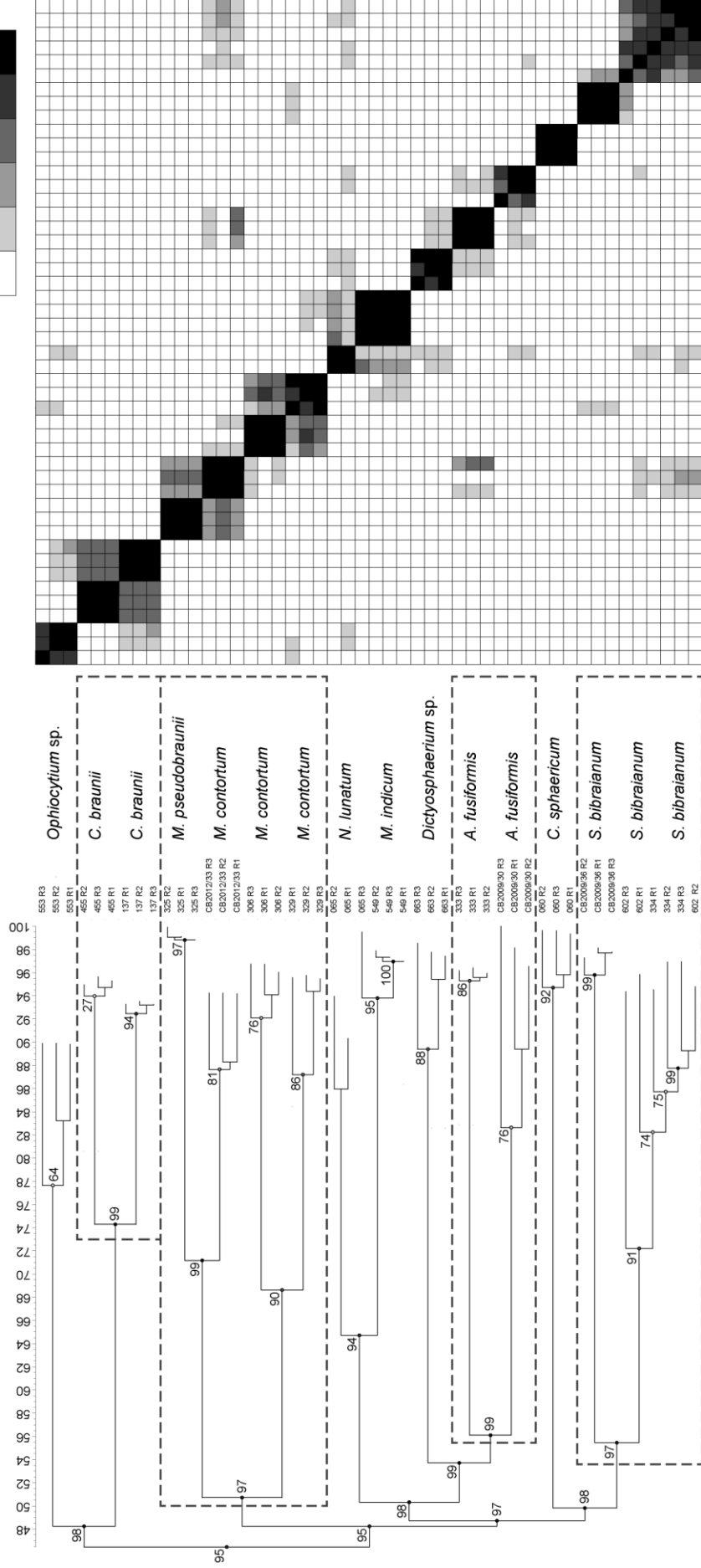


Figura 11. Dendrograma baseado nos espectros de massas altas (2 - 20 kDa) das células das réplicas de cultivo.

Dessa forma a utilização de diferentes extensões de massas pode contribuir para a resolução de problemas taxonômicos distintos. Enquanto em massas baixas os gêneros *Monoraphidium* e *Ankistrodesmus* não são distinguíveis, em massas altas a separação é evidente. Porém essa distinção coloca o gênero *Ankistrodesmus* distante do clado que agrupa os gêneros *Selenastrum* e *Monoraphidium* em um cluster elaborado com os espectros médios das cepas (Figura 12).

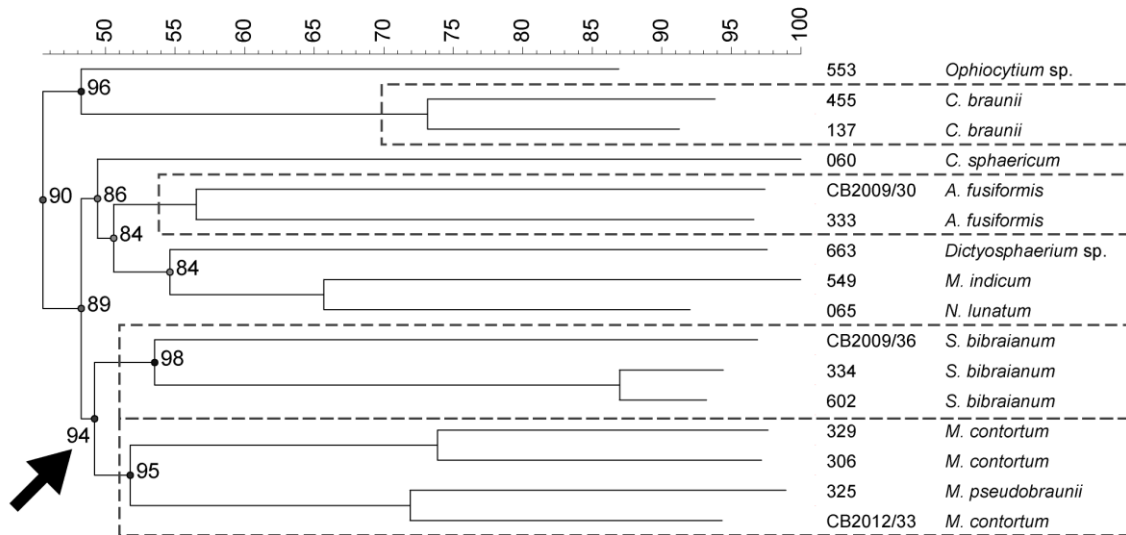


Figura 12. Dendrograma baseado nos espectros médios de massas altas (2 – 20 kDa) das cepas.

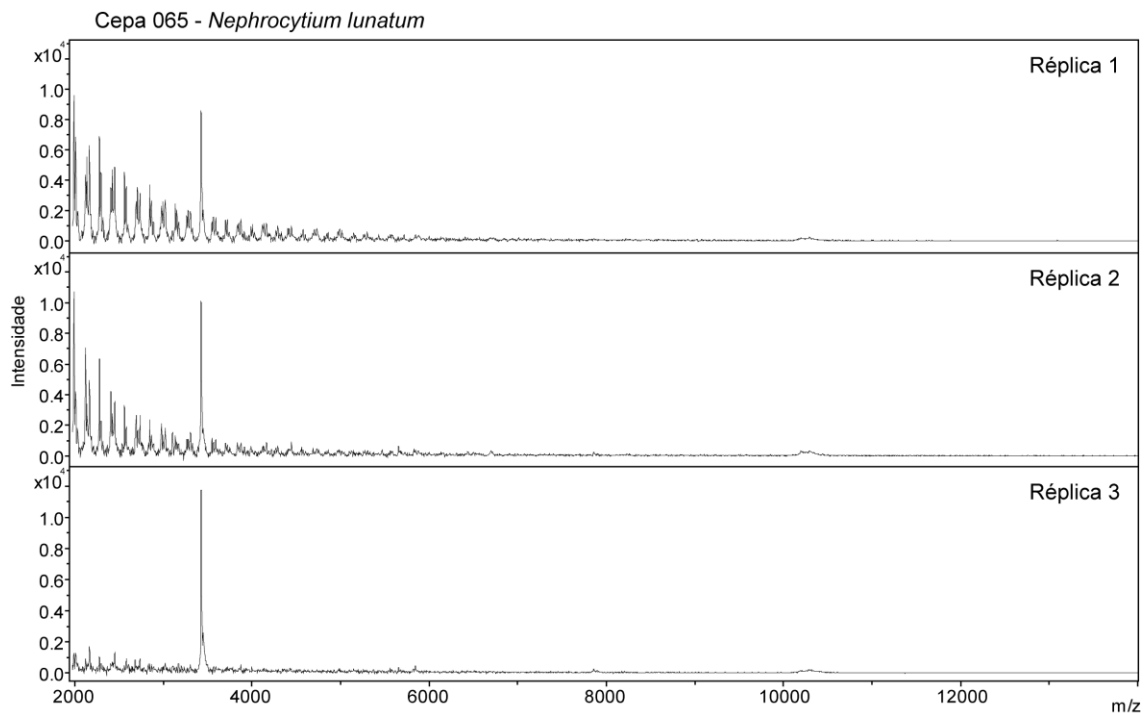


Figura 13. Comparação entre os espectros das réplicas de *N. lunatum* (065).

4.5. MATÉRIA ORGÂNICA DISSOLVIDA (MOD)

4.5.1. MASSAS BAIXAS (400 – 2000 DA)

Os espectros de massas baixas adquiridos para a MOD foram praticamente todos iguais, incluindo espectros obtidos com uma mistura de matriz com acetona (solvente utilizado na eluição da matéria orgânica das colunas). Isso indica que provavelmente os picos dos espectros obtidos não são das amostras, mas sim resultantes de íons da própria matriz e/ou de algum solvente. A Figura 14 mostra uma comparação de alguns espectros obtidos. Devido à grande semelhança dos espectros não foi possível a realização de uma análise de cluster para a MOD nessa extensão de massas.

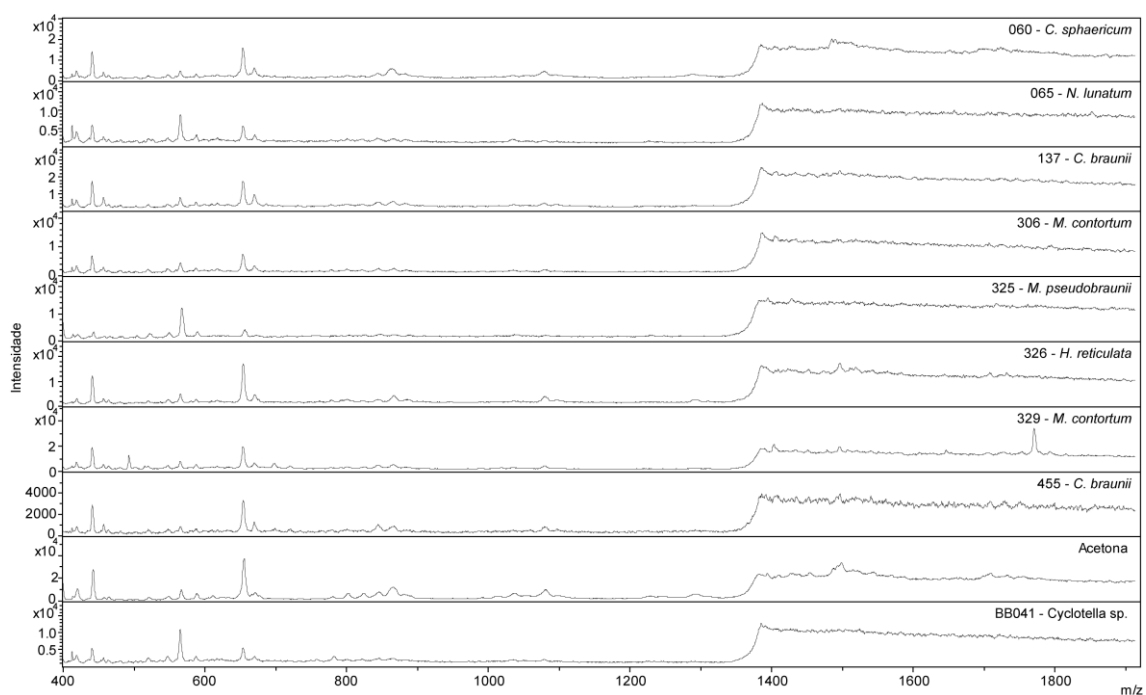


Figura 14. Exemplos de espectros de massas baixas obtidos com a MOD de diferentes cepas.

4.5.2. MASSAS ALTAS (2000 – 20000 DA)

A obtenção de espectros de massas altas da MOD foi satisfatória para nove cepas, ou seja, em nove das 18 cepas não foi possível obter picos com uma intensidade superior aos ruídos. A ausência de picos nos espectros dessas cepas pode ser resultado da pequena quantidade de material analisado associado a uma baixa produção de matéria orgânica que é excretada. A Figura 15 representa a análise de cluster realizada com base nos espectros obtidos.

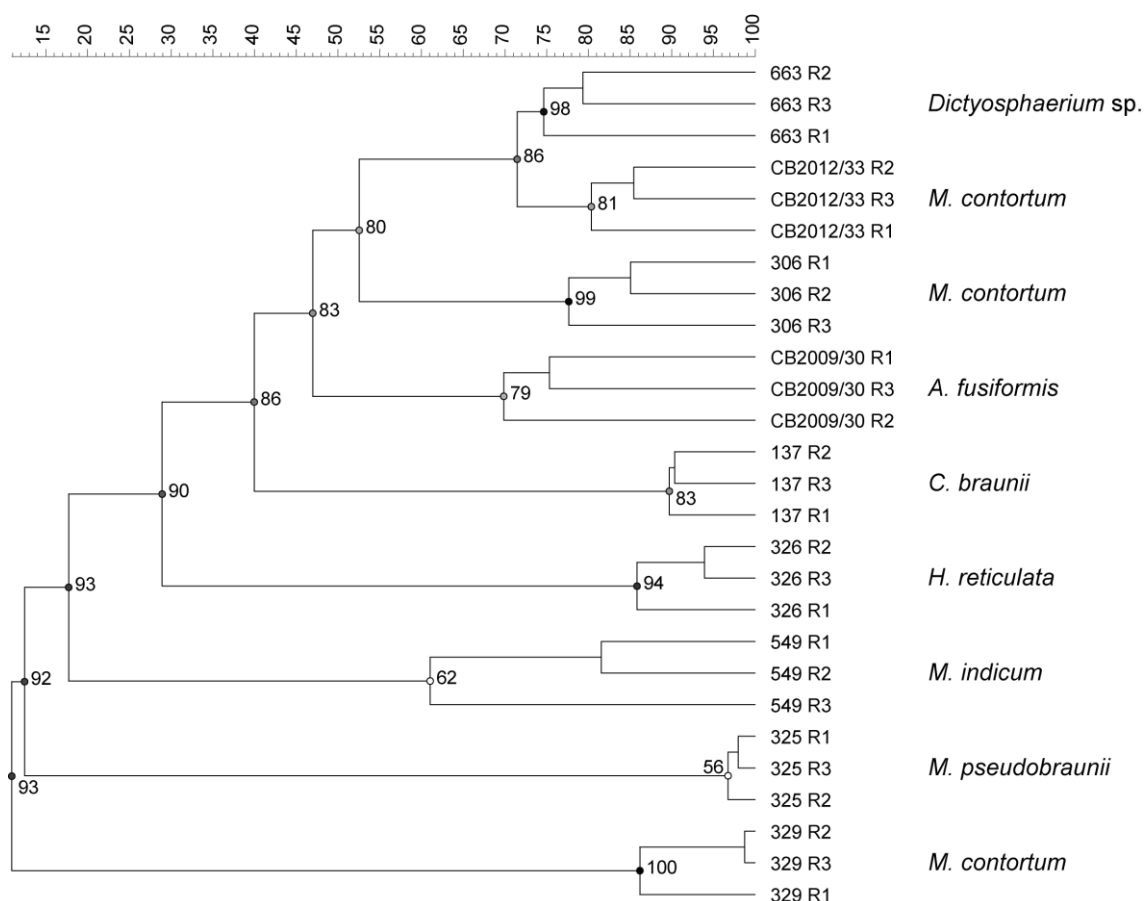


Figura 15. Cluster baseado nos espectros de massas altas (2 - 20 kDa) da MOD das réplicas de cultivo.

As diferenças entre os espectros da MOD das cepas permitiram discriminação dessas. No entanto, somente foram obtidos espectros de cepas diferentes de uma mesma espécie para *M. contortum* (329, 306 e CB2012/33). Assim não é possível avaliar a capacidade da distinção de espécies através de espectros da MOD, uma vez que mesmo a utilização das células não permitiu o agrupamento de todas as cepas dessa espécie em um único clado.

Esses testes foram de grande valia para futuros experimentos de estudos de associações algas/bactérias altamente específicas (populações bacterianas associadas a excretados de algumas espécies de microalgas de um mesmo gênero), pois permite decidir qual dos excretados devem ser usados.

4.6. IDADE DO CULTIVO E VARIAÇÃO DA MOD

A análise de massas baixas não apresentou intensidade suficiente para a obtenção de espectros para nenhuma das cepas em nenhum dos dias estudados. No entanto com a análise de massas altas foi possível obter espectros (Figura 16). A qualidade dos espectros variou conforme os dias de cultivo. Todas as cepas apresentaram espectros sem

intensidade de sinais com quatro dias de cultivo. Para a cepa 333 (*A. fusiformis*) esse quadro manteve-se até a análise com 25 dias de cultivo, apresentando intensidade de picos superior aos ruídos somente com 32 dias.

A cepa CB2009/33 (*M. contortum*) começou a apresentar intensidade de sinais após 11 dias de cultivo. Estes picos possuem características de compostos poliméricos e há um aumento da intensidade dos picos com maior relação massa carga com o passar do tempo. A cepa 047 (*S. bibraianum*) também começa a apresentar picos após 11 dias de cultivo. Contudo os picos não são compostos poliméricos e com maior tempo de cultivo ocorre um aumento da intensidade dos picos de compostos com menor relação massa carga.

A intensidade de sinais, presentes em todas as cepas, no período de 32 dias pode ser explicada pelo fato de a quantidade de células ser maior, havendo assim uma maior produção de MOD. Além disso após este tempo os cultivos atingem a fase estacionária; fase em que a produção de MOD é maior quando comparada à fase exponencial de crescimento (Giroldo & Vieira, 2005). Esses resultados corroboram o estudo de Nicolau *et al.* (2014), em que verificaram mudanças na MOD de espécies de diatomáceas de acordo com a idade do cultivo.

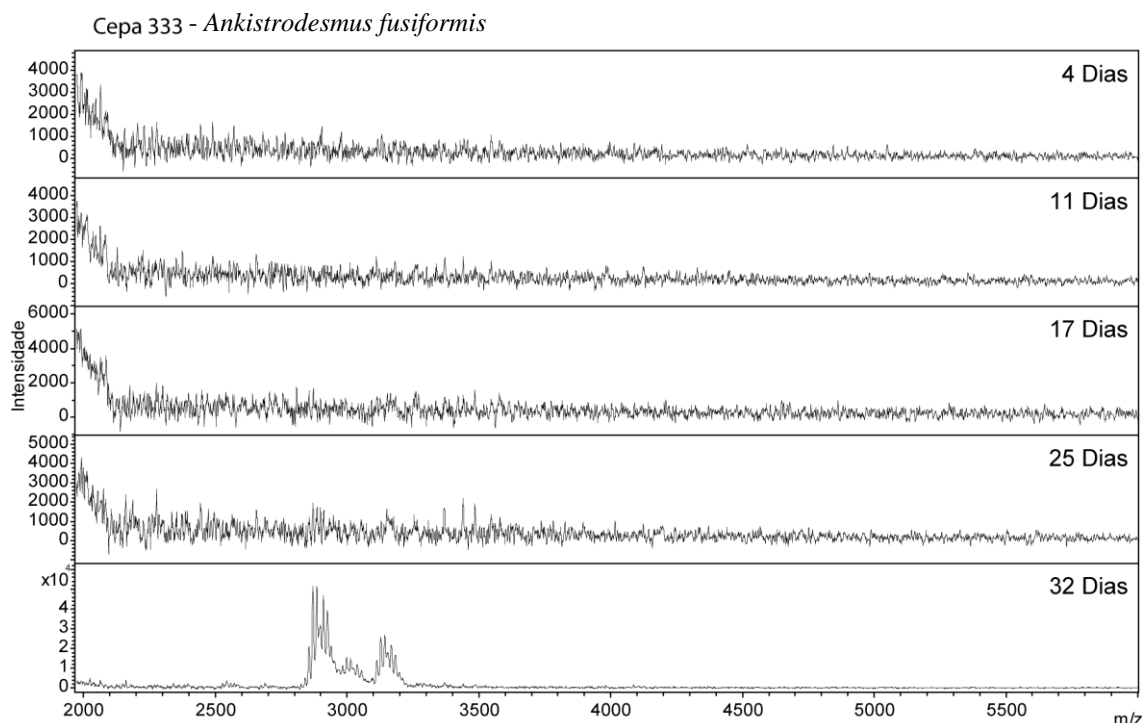


Figura 16. (Continua)

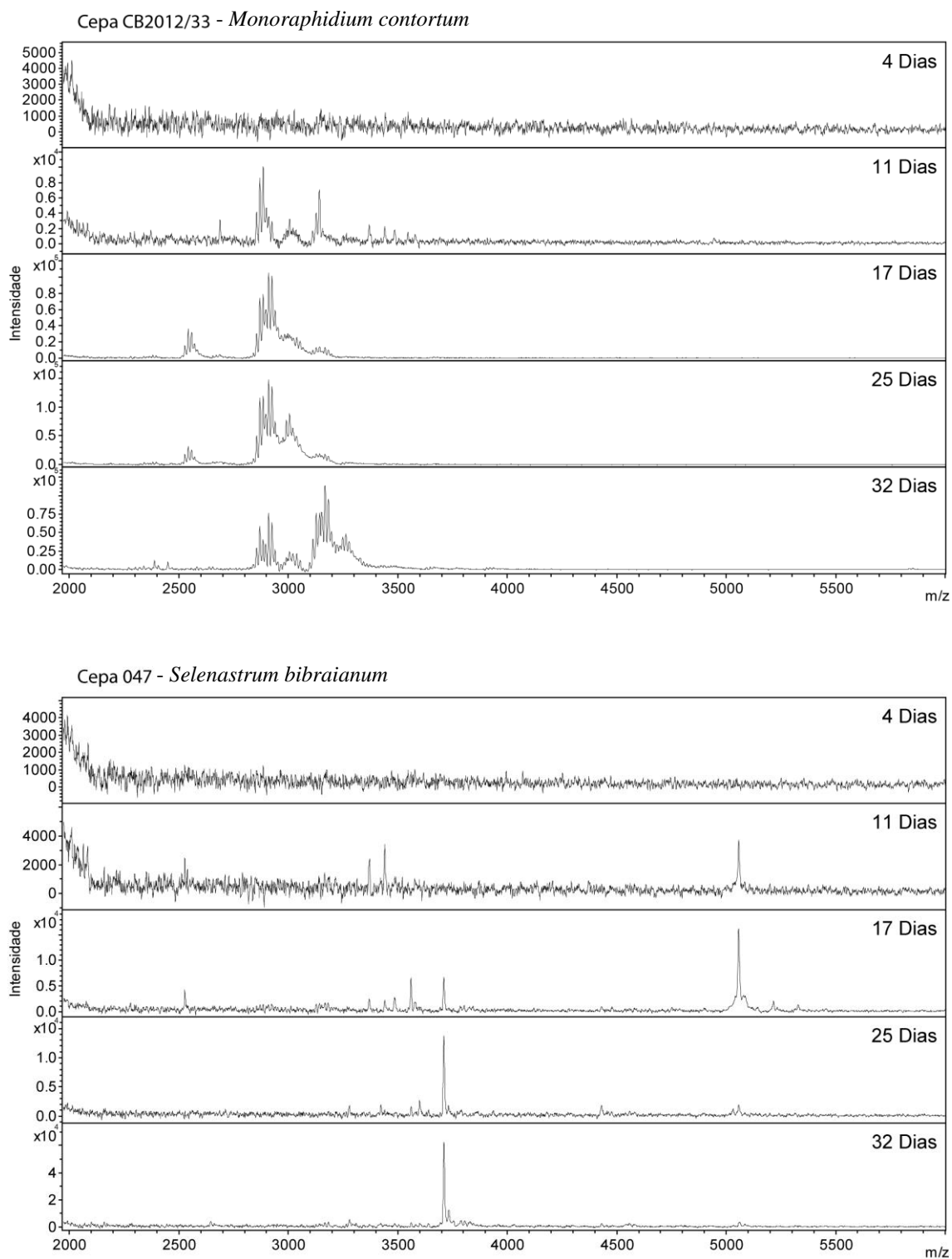


Figura 16. Variação da Matéria Orgânica Dissolvida (MOD) ao longo do crescimento. Espectros de massas altas com subtração da linha de base. As massas acima de 6 kDa foram omitidas por não haver picos.

5. CONCLUSÕES

Os espectros obtidos das células possibilitaram, através das análises de cluster, a distinção de todas as cepas. A distinção das espécies também foi possível, com exceção das espécies do gênero *Monoraphidium*, que é provavelmente um grupo polifilético. Os espectros tanto de massas altas quanto de massas baixas permitiram o agrupamento das cepas de *C. braunii* (455 e 137) e de *S. bibraianum* (334, 602 e CB2009/36), sendo que para esta última os espectros evidenciaram uma diferença entre cepas isoladas de continentes diferentes.

As cepas de *A. fusiformis* (333 e CB2009/30) ficaram agrupadas com as análises baseadas em massas altas. Contudo as análises baseadas em massas baixas agruparam essas cepas com as cepas do gênero *Monoraphidium* (306, 325, 329, 549 e CB2012/33), havendo grande similaridade entre os espectros dessas cepas.

Os experimentos com a MOD foram realizados como testes preliminares para estudos futuros. Nesses estudos poderão ser investigados os compostos que são produzidos, analisando possíveis aplicações econômicas. Também serão analisadas as relações de diferentes comunidades bacterianas que vivem associadas aos compostos excretados por comunidades de microalgas de água doce. Essas informações podem ser de grande valia, como parte de estudos de taxonomia polifásica, auxiliando no entendimento das relações taxonômicas das microalgas.

Os dados obtidos com a MOD evidenciaram a possibilidade de seu uso para a obtenção de espectros por MALDI-TOF. No entanto novos protocolos de preparação das amostras ainda devem ser testados, com diferentes matrizes e quantidades de material. Os resultados mostram que a quantidade da MOD produzida em diferentes fases do cultivo também deve ser levada em consideração.

Assim o grande número de amostras que podem ser colocadas no aparelho de uma única vez associado ao processo automático de obtenção de espectros também favorece a praticidade da técnica, o que possibilita a obtenção de um grande conjunto de dados capazes de caracterizar cepas e espécies de microalgas em pouco tempo.

6. REFERÊNCIAS

- Amiri-Eliasi, B., & Fenselau, C. (2001). Characterization of Protein Biomarkers Desorbed by MALDI from Whole Fungal Cells. *Anal Chem*, 73(21), 5228-5231. doi: 10.1021/ac010651t
- Andrade, L. M., Mendes, M. A., Kowalski, P., & Nascimento, C. A. (2015). Comparative study of different matrix/solvent systems for the analysis of crude lyophilized microalgal preparations using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 29(3), 295-303. doi: 10.1002/rcm.7110
- Barbano, D., Diaz, R., Zhang, L., Sandrin, T., Gerken, H., & Dempster, T. (2015). Rapid Characterization of Microalgae and Microalgae Mixtures Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS ONE*, 10(8), e0135337. doi: 10.1371/journal.pone.0135337
- Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1989). Cinnamic acid derivatives as matrices for ultraviolet laser desorption mass spectrometry of proteins. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 3(12), 432-435. doi: 10.1002/rcm.1290031207
- Begon, M., Townsend, C. R., & Harper, J. L. (2006). *Ecology : from individuals to ecosystems* (4th ed.). Malden, MA: Blackwell Pub.
- Bux, F., & Chisti, Y. (2016). *Algae Biotechnology: Products and Processes*: Springer.
- Calderaro, A., Arcangeletti, M. C., Rodighiero, I., Buttrini, M., Gorrini, C., Motta, F., . . . De Conto, F. (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci Rep*, 4, 6803. doi: 10.1038/srep06803
- Calderaro, A., Gorrini, C., Piccolo, G., Montecchini, S., Buttrini, M., Rossi, S., . . . Medici, M. C. (2014). Identification of *Borrelia* species after creation of an in-house MALDI-TOF MS database. *PLoS ONE*, 9(2), e88895. doi: 10.1371/journal.pone.0088895
- Calderaro, A., Piergianni, M., Buttrini, M., Montecchini, S., Piccolo, G., Gorrini, C., . . . De Conto, F. (2015). MALDI-TOF mass spectrometry for the detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar*. *PLoS ONE*, 10(4), e0122448. doi: 10.1371/journal.pone.0122448

- Dai, Y., Whittall, R. M., & Li, L. (1999). Two-layer sample preparation: a method for MALDI-MS analysis of complex peptide and protein mixtures. *Anal Chem*, *71*(5), 1087-1091.
- Emami, K., Hack, E., Nelson, A., Brain, C. M., Lyne, F. M., Mesbahi, E., . . . Caldwell, G. S. (2015). Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. *Sci Rep*, *5*, 10036. doi: 10.1038/srep10036
- Garcia, T. S., Bock, C., Sant'Anna, C. L., Bagatini, I. L., Wodniok, S., & Vieira, A. A. H. (2017). Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): rbcL, 18S rDNA and ITS-2 secondary structure enlightens traditional taxonomy, with description of two new genera, *Messastrum gen. nov.* and *Curvastrum gen. nov.* *Fottea*.
- Georgescu-Roegen, N. (1975). Energy and Economic Myths. *Southern Economic Journal*, *41*(3), 347-381. doi: 10.2307/1056148
- Ghasemi, Y., Rasoul-Amini, S., Naseri, A. T., Montazeri-Najafabady, N., Mobasher, M. A., & Dabbagh, F. (2012). Microalgae biofuel potentials (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, *48*(2), 126-144. doi: 10.1134/s0003683812020068
- Giroldo, D. & Vieira, A. A. H. (2005). Polymeric and free sugars released by three phytoplanktonic species from a freshwater tropical eutrophic reservoir. *Journal of Plankton Research*. *27*: 695-705.
- Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P., & Harrison, S. T. (2011). Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J Microbiol Methods*, *85*(2), 119-123. doi: 10.1016/j.mimet.2011.02.005
- Gross, J. H. (2011). *Mass Spectrometry: A Textbook* (2 ed.): Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Guillard, R. R. L., & Lorenzen, C. J. (1972). Yellow-green algae with chlorophyllide C^{1,2}. *Journal of Phycology*, *8*(1), 10-14. doi: 10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x
- Guschina, I. A., & Harwood, J. L. (2006). Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Prog Lipid Res*, *45*(2), 160-186. doi: 10.1016/j.plipres.2006.01.001
- Hillenkamp, F., Karas, M., Beavis, R. C., & Chait, B. T. (1991). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of biopolymers. *Anal Chem*, *63*(24), 1193A-1203A.
- Hoek, C. v. d., Mann, D. G., & Jahns, H. M. (1995). *Algae : an introduction to phycology*. Cambridge ; New York: Cambridge University Press.

- Hoffmann, E. (1996). *Mass spectrometry*: Wiley Online Library.
- Krienitz, L., & Bock, C. (2012). Present state of the systematics of planktonic coccoid green algae of inland waters. *Hydrobiologia*, *698*(1), 295-326. doi: 10.1007/s10750-012-1079-z
- Krienitz, L., Ustinova, I., Friedl, T., & Huss, V. A. R. (2001). Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal of Phycology*, *37*(5), 852-865. doi: 10.1046/j.1529-8817.2001.01004.x
- Lee, F. W.-F., Ho, K. C., & Lo, S. C.-L. (2008). Rapid identification of dinoflagellates using protein profiling with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Harmful Algae*, *7*(4), 551-559. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.hal.2007.12.001>
- Lee, H. W., Roh, S. W., Cho, K., Kim, K. N., Cha, I. T., Yim, K. J., . . . Kim, D. (2015). Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Talanta*, *132*, 630-634. doi: 10.1016/j.talanta.2014.08.078
- Lewis, J. K., Wei, J., & Siuzdak, G. (2006). Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry in Peptide and Protein Analysis *Encyclopedia of Analytical Chemistry*: John Wiley & Sons, Ltd.
- Likens, G. E. (1975). Primary Production of Inland Aquatic Ecosystems. In H. Lieth & R. H. Whittaker (Eds.), *Primary Productivity of the Biosphere* (pp. 185-202). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Murugaiyan, J., Ahrholdt, J., Kowbel, V., & Roesler, U. (2012). Establishment of a matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry database for rapid identification of infectious achlorophyllous green micro-algae of the genus Prototheca. *Clin Microbiol Infect*, *18*(5), 461-467. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03593.x
- Nicolau, A., Sequeira, L., Santos, C., & Mota, M. (2014). Matrix-assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applied to diatom identification: influence of culturing age. *Aquatic Biology*, *20*(2), 139-144.
- Paz, B., Riobo, P., & Franco, J. M. (2011). Preliminary study for rapid determination of phycotoxins in microalgae whole cells using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, *25*(23), 3627-3639. doi: 10.1002/rcm.5264

- Phillipson, J. (1966). *Ecological Energetics*. London: Edward Arnold.
- Pulz, O., & Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65(6), 635-648. doi: 10.1007/s00253-004-1647-x
- Reynolds, C. S. (2006). *Ecology of phytoplankton*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Rodhe, H. (1990). A comparison of the contribution of various gases to the greenhouse effect. *Science*, 248(4960), 1217-1219. doi: 10.1126/science.248.4960.1217
- Ryan, C., Green, T. B., Hartley, A., Browning, B., & Garvin, C. (2009). *Cultivation Clean Energy: The Promise of Algae Biofuels*.
- Rysanek, D., Hrcakova, K., & Skaloud, P. (2015). Global ubiquity and local endemism of free-living terrestrial protists: phylogeographic assessment of the streptophyte alga Klebsormidium. *Environ Microbiol*, 17(3), 689-698. doi: 10.1111/1462-2920.12501
- Sandrin, T. R., Goldstein, J. E., & Schumaker, S. (2013). MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom Rev*, 32(3), 188-217. doi: 10.1002/mas.21359
- Shih, C. J., Chen, S. C., Weng, C. Y., Lai, M. C., & Yang, Y. L. (2015). Rapid identification of haloarchaea and methanoarchaea using the matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Sci Rep*, 5, 16326. doi: 10.1038/srep16326
- Smith, V. H., Tilman, G. D., & Nekola, J. C. (1999). Eutrophication: impacts of excess nutrient inputs on freshwater, marine, and terrestrial ecosystems. *Environ Pollut*, 100(1-3), 179-196.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., & Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*, 101(2), 87-96. doi: 10.1263/jbb.101.87
- Starostin, K. V., Demidov, E. A., Bryanskaya, A. V., Efimov, V. M., Rozanov, A. S., & Peltek, S. E. (2015). Identification of Bacillus strains by MALDI TOF MS using geometric approach. *Sci Rep*, 5, 16989. doi: 10.1038/srep16989
- Treviño, I. F. (2008). *Estudios taxonómicos en algas verdes cocales del sur de España*. (Tesis Doctoral), Universidad de Granada, Granada. Retrieved from <http://hdl.handle.net/10481/1945>

- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60(2), 407-438.
- Williams, P. J. I. B., & Laurens, L. M. L. (2010). Microalgae as biodiesel & biomass feedstocks: Review & analysis of the biochemistry, energetics & economics. *Energy & Environmental Science*, 3(5), 554-590. doi: 10.1039/B924978H
- Zhang, L., Smart, S., & Sandrin, T. R. (2015). Biomarker- and similarity coefficient-based approaches to bacterial mixture characterization using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Sci Rep*, 5, 15834. doi: 10.1038/srep15834