

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

**IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE: CONSTRUÇÃO
DE BANCO DE DADOS E AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES
PLANCTÔNICAS ATRAVÉS DE MALDI-TOF MS**

Rodrigo Ventura de Mello

São Carlos
2023

RODRIGO VENTURA DE MELLO

**IDENTIFICAÇÃO DE MICROALGAS DE ÁGUA DOCE: CONSTRUÇÃO DE BANCO DE DADOS E
AVALIAÇÃO DE INTERAÇÕES PLANCTÔNICAS ATRAVÉS DE MALDI-TOF MS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar – *campus* São Carlos), como parte dos requisitos para a obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS, Área de Concentração: ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS
Orientadora: Prof^a Dr^a Inessa Lacativa Bagatini

São Carlos
2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do Candidato Rodrigo Ventura de Mello, realizada em 30/08/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Inessa Lacativa Bagatini (UFSCar)

Prof. Dr. Armando Augusto Henriques Vieira (UFSCar)

Profa. Dra. Thais Garcia da Silva (UFSCar)

Prof. Dr. Daniel Rodrigues Cardoso (IQSC/USP)

Profa. Dra. Sinara Teixeira do Brasil Moraes (USP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

AGRADECIMENTOS

À Professora Doutora Inessa Lacativa Bagatini, minha indescritível gratidão por sua dedicação, orientação, conversas, ensinamentos, críticas, estímulos, confiança e imensuráveis paciência, compreensão e gentileza.

Ao Professor Doutor Armando Augusto Henriques Vieira por contribuições e discussões fundamentais durante o mestrado e na defesa da tese, disposto a colaborar mesmo após a aposentadoria.

À Professora Doutora Ana Teresa Lombardi por suas contribuições durante a qualificação, pela disponibilização de equipamentos de seu laboratório e por todo auxílio fornecido em conversas sobre a pós-graduação.

Ao Professor Doutor Daniel Rodrigues Cardoso pelo auxílio e parceria estabelecida para a execução dos experimentos com o MALDI-TOF MS, pelas contribuições na qualificação, defesa da tese e na construção do trabalho como um todo.

À Doutora Sinara Teixeira do Brasil Moraes por sua grande ajuda e rapidez na obtenção dos espectros e contribuições na defesa.

À Doutora Thaís Garcia da Silva por suas contribuições em conversas de laboratório e durante a defesa.

Ao Professor Doutor Edson Rodrigues Filho por suas contribuições na qualificação e disponibilizar o equipamento, atualmente inoperante, em que se iniciou o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Ficologia por todas as conversas, companhia, auxílio e apoio: Ana Beatriz, Ana Eliza, Ana Luiza, Juliana, Letícia, Lucas, Maryssa, Naiara, Nathan, Thaís Chaves e Thaís Garcia. Também agradeço ao Luiz por nossas longas conversas e estar sempre disposto a ajudar e tirar dúvidas sobre procedimentos e equipamentos do laboratório.

Aos órgãos de fomento pela concessão da bolsa durante o doutorado (CNPq) e auxílio financeiro às pesquisas do laboratório (CNPq, CAPES e FAPESP), sem os quais não haveria o material para estudo.

À secretaria do PPGERN, Beth, João e Roseli, por esclarecimentos, lembretes e auxílio burocráticos ao longo de toda minha formação na pós-graduação.

À Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) pela infraestrutura e formação acadêmica proporcionadas.

Aos meus pais Cristina e Ocimar, e meu irmão André, por seu apoio, amor, empenho, entendimento e esforço, sem medidas, para que não me faltasse nada e que fosse possível chegar até aqui. A conclusão desse trabalho não seria possível sem vocês, obrigado por estarem ao meu lado.

Obrigado, por também estar ao meu lado, à Karen, que com sua paciência, compreensão, amor e carinho me apoiou nesse trabalho e na vida.

Aos amigos Patrícia e Danilo (com a recém-chegada Elis), Fabrício (com o Felipe chegando) , Laís e Renê (fisicamente distantes, mas sempre em contato) pelas diversas e inúmeras conversas e descontrações. Vocês são fundamentais na minha vida.

Por fim, agradeço aos colegas de trabalho, professores, familiares, amigos e alunos, que colaboraram de alguma forma com minha formação e construção desse trabalho, direta ou indiretamente.

Eu não teria chegado até aqui sem a ajuda de cada um de vocês.

MUITO OBRIGADO!

“A única coisa que faz a vida possível é a permanente e intolerável incerteza. Não saber o que vem depois.”

— Ursula K. Le Guin, *A Mão Esquerda da Escuridão* (1969)

RESUMO

As microalgas de água doce constituem um grupo bastante diverso e de grande importância ecológica. No entanto a delimitação de espécies em alguns grupos permanece inconclusiva. A ausência ou dificuldade de registro de reprodução sexuada no grupo implica na necessidade de utilização de outros conceitos de espécies além do conceito biológico. A abordagem integrativa, que inclui análises morfológicas, quimiotaxonômicas, biomoleculares e dados fisiológicos e ecológicos, se mostra cada vez mais importante para uma melhor delimitação de espécies de microalgas. A inclusão do conceito ecológico de espécies na abordagem integrativa permite maior entendimento da diversidade funcional desses organismos. A Espectrometria de Massa por Dessorção/Ionização a Laser Assistida por Matriz com analisador por Tempo de Voo (MALDI-TOF MS) é uma ferramenta com potencial para distinção de cepas e espécies de microalgas, porém bancos de dados com espectros de referências de microalgas são inexistentes. Assim, implementamos um banco de dados com 23 cepas axênicas e testamos a sua capacidade de identificação de cepas e espécies de microalgas em um *software* livre. A identificação por similaridade dos espectros mostrou uma capacidade satisfatória de diferenciação de cepas e espécies, mesmo com cultivos realizados sob diferentes condições abióticas. Também comparamos os espectros de MALDI-TOF de 18 cepas de espécies próximas cultivadas em condições axênicas com os espectros das mesmas cepas em tratamentos distintos com duas bactérias, a fim de integrar dados ecológicos – de interação de espécies – na delimitação específica de uma família de microalgas verdes cocoides. As cepas de *A. densus* e *A. fusiformis* apresentaram respostas semelhantes de produção de metabólitos quando em cocultivos com bactérias. Duas cepas, CCMA-UFSCar 131 e 024, apresentaram ser possivelmente uma nova espécie e um caso de classificação equivocada, respectivamente. O banco de espectros pode ser de grande ajuda na rápida identificação de microalgas. Juntamente com os dados ecológicos, a identificação por espectros de MALDI-TOF pode auxiliar na complexa delimitação específica das microalgas verdes de água doce.

Palavras-Chave: Delimitação Específica; Identificação; MALDI-TOF; Interações Ecológicas; Taxonomia

ABSTRACT

Freshwater microalgae constitute a very diverse group with major ecological importance. However, the delimitation of species in some groups remains inconclusive. The absence or difficulty of recording sexual reproduction in the group implies the need to use other species concepts in addition to the biological concept. The integrative approach, which includes morphological, chemotaxonomic, biomolecular analyses, and physiological and ecological data, is proving increasingly important for a better delimitation of microalgae species. The inclusion of the ecological concept of species in the integrative taxonomy allows a better understanding of the functional diversity of these organisms. Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a tool with potential for distinguishing strains and species of microalgae, but databases with reference spectra of microalgae are nonexistent. Thus, we implemented a database with 23 axenic strains and tested its ability to identify strains and species of microalgae in an open-source software. The identification by spectra similarity showed a satisfactory ability to differentiate strains and species, even with cultures performed under different abiotic conditions. We also compared the MALDI-TOF MS spectra of 18 strains of closely related species grown in axenic conditions with the spectra of the same strains in different treatments with two bacteria, to integrate ecological data – of species interaction – in the specific delimitation of a family of coccoid green microalgae. Strains of *A. densus* and *A. fusiformis* showed similar responses of metabolite production when cocultured with bacteria. Two strains, CCMA-UFSCar 131 and 024, were shown to be possibly a new species and a case of misclassification, respectively. The spectra database can be of great help in the rapid identification of microalgae. Together with the ecological data, the identification by MALDI-TOF MS can help in the complex specific delimitation of freshwater green microalgae.

Keywords: Specific delimitation; Identification; MALDI-TOF; Ecological Interactions; Taxonomy

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
AEC	Antes da Era Comum
CCMA <i>ou</i> CCMA-UFSCar	Coleção de Culturas de Microalgas de Água Doce da Universidade Federal de São Carlos
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administration
GFP	Green Fluorescent Protein
GRAS	Generally Recognized as Safe
HCCA	α -cyano-4-hydroxycinnamic Acid
LED	Light Emitting Diode
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization
MS	Mass Spectrometry
NMDS	Non-Metric Multidimensional Scaling
PERMANOVA	Permutational Multivariate Analysis of Variance
PIE	Pulsed Ion Extraction
PTFE	Polytetrafluoroethylene
PUFA	Polyunsaturated Fatty Acids
PVC	Polyvinyl Chloride
TFA	Trifluoroacetic Acid
TOF	Time of Flight
TSP	Triple Superphosphate
UI	Unidentified
UVB	Radiação Ultravioleta B

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Hipótese filogenética simplificada (adaptado de Baldauf, 2013) da classificação com 8 grupos, sendo que 6 destes incluem organismos que são comumente chamados de “algas”.	17
Figura 1.2. Exemplo de comparação do tamanho de uma macroalga com as microalgas.	18
Figura 1.3. Secção horizontal de um lago com as comunidades planctônicas e bentônicas.	19
Figura 1.4. Número de publicações contendo o termo “ <i>microalgae</i> ” indexadas na base de dados Web of Science por ano. A base de dados utilizada contém registros de publicações a partir do ano de 1945, no entanto a primeira publicação com o termo pesquisado aparece somente em 1962. Os anos sem marcações (1966 e 1967) na série correspondem a 0 registros de publicações.	21
Figura 1.5. Exemplos de importâncias e aplicações de Microalgas, tanto em aspectos econômicos quanto ecológicos.	23
Figure 3.1. Cluster of biological replicates (different cultures of the strains). The first tree number of the labels refers to the CCMA-UFSCar strain code, and the number after this refers to the number of the culture replicate that was randomly selected for the spectra. This illustrative dendrogram was performed with the Horn distance method and the average clustering method. The cophenetic correlation for this cluster is 0.9237.	77
Figure 3.2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented.	78
Figure 3.3. Heatmap of the Horn dissimilarity matrix, with dendrogram clustered using the average algorithm, between the summary spectra of each microalgal strain.	79
Figure 3.4. Script output with the identification, by Horn dissimilarity, of sample 333 from Mello et al. (2017) using the in-house reference spectra database. The table is ordered from the lowest dissimilarity to the highest, showing that the top nine similarities with the tested spectrum are all of strains that are classified in the same genus.	81

Figure 4.1. Pseudogel visualization of the spectra of one algal strain under the different treatments (axenic and cocultured) and their respective spectra of the used bacteria cultured without the algal cells..... 109

Figure 4.2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots of MALDI-TOF mass spectra of cultures with different treatments: axenic strains (green lines), cocultured with bacteria 1 (red lines) and with bacteria 2 (yellow lines)..... 110

Figure 4.3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of axenic strains cultures showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented. 111

Figure 4.4. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the microalgal strains cultured with bacteria 1 showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented..... 112

Figure 4.5. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the microalgal strains cultured with bacteria 2 showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented..... 114

Figure 4.6. Heatmap of the Horn Dissimilarity Matrix between the mean spectra of each treatment (axenic and cocultures) of the microalgal strains. The coupled dendrogram is clustered with the average algorithm. 116

LISTA DE TABELAS

Table 3.1. All microalgal strains used in this study are from the Freshwater Microalgae Culture Collection - UFSCar (Portuguese acronym CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853). RO = Roraima State, Brazil; SP = São Paulo State, Brazil; MG = Minas Gerais State, Brazil. Different superscripted letters indicate different counties in the same state.....	71
Table 3.2. Organization of biological ¹ , technical ² and acquisition ³ replicates.	73
Table 4.1. Microalgal strains used in this study are from the Freshwater Microalgae Culture Collection - UFSCar (Portuguese acronym CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853) and Christina Bock personal collection (CB strains). BR = Brazil; KE = Kenya; FR = France; DE = Germany. Different superscripted letters indicate different locations from same country.....	105
Table 4.2. MALDI-TOF MS equipment configurations.....	107

APRESENTAÇÃO DA TESE

A tese é o resultado “final” de um doutorado. Após quatro anos de leituras, revisões, planejamento, experimentos, frustrações, novos experimentos, mais leituras, interpretações e um bocado de desespero, enfim se constrói uma tese. Coloco final entre aspas, pois obviamente não é com a tese que o trabalho termina. Além das ideias que surgem para novos trabalhos, durante os experimentos, os resultados que foram obtidos deverão ser publicados para a comunidade científica na forma de artigos publicados em periódicos.

Este texto encontra-se dividido em três partes principais, com seis itens enumerados. A primeira parte conta com uma introdução ao tema central deste trabalho, as algas (item 1). Escrito em português, inclui explicações conceituais sobre esses organismos, importâncias, dificuldades e diferentes técnicas empregadas nesta área. Na sequência, estão as hipóteses e objetivos (item 2) do trabalho, sendo que o embasamento para esses se encontra nas introduções dos capítulos 1 e 2 (itens 3 e 4). Vale ainda ressaltar que as classificações das cepas utilizadas neste trabalho podem variar com o tempo, uma vez que os métodos de identificação estão sendo aprimorados.

A segunda parte conta com dois capítulos (itens 3 e 4), escritos em inglês, formatados como artigos a serem publicados em periódicos científicos. Esses são fruto dos experimentos desenvolvidos ao longo dos anos de trabalho do doutorado. A terceira parte (itens 5 e 6) é o fechamento do texto aqui apresentado. Essa, escrita em português, visa conferir coesão ao trabalho como um todo, apresentando uma discussão e uma conclusão geral que dialoga com os dois artigos produzidos.

Tais decisões, sobre formato, estrutura e línguas de redação, foram tomadas a fim de conciliar praticidade para a divulgação do trabalho (publicações em inglês) com a acessibilidade para um público mais abrangente e sem formação acadêmica específica (texto em português).

SUMÁRIO

Resumo.....	7
Abstract.....	8
Lista de Siglas e Abreviaturas.....	9
Lista de Figuras.....	10
Lista de Tabelas.....	12
Apresentação da Tese.....	13
Sumário.....	14
1 Introdução.....	16
1.1. Quem são as “Algas”?.....	16
1.2. O estudo das microalgas.....	19
1.3. Importâncias das microalgas.....	21
1.4. Ecologia das microalgas.....	37
1.5. Identificação das microalgas.....	39
1.6. Referências.....	43
2 Hipóteses e Objetivos.....	65
2.1. Hipóteses.....	65
2.2. Objetivos.....	65
3 Capítulo 1.....	67
3.1. Abstract.....	67
3.2. Introduction.....	67
3.3. Material and Methods.....	70
3.3.1. Strains.....	70
3.3.2. Growth Curves Determination.....	70
3.3.3. Cultures and Samples Preparation for MALDI-TOF.....	72
3.3.4. Spectra Acquisition.....	72
3.3.5. Spectra Treatment.....	73
3.3.6. In-House Spectra Database.....	74
3.3.7. Database Validation and Identification Tests.....	75
3.4. Results and Discussion.....	76
3.4.1. Obtained Spectra and Database Assemble.....	76
3.4.2. Database Validation.....	76

3.4.3. Identification Tests	79
3.4.4. Database Utilization	85
3.5. Conclusions	85
3.6. Acknowledgements	86
3.7. Supplementary Materials	87
3.8. References	95
4 Capítulo 2	101
4.1. Abstract	101
4.2. Introduction	102
4.3. Material and Methods	104
4.3.1. Microalgal Strains	104
4.3.2. Microorganisms Isolation for Microalgal Coculturing	104
4.3.3. Experimental Cultures	105
4.3.4. Sample Preparation for MALDI-TOF	106
4.3.5. Spectra Acquisition	107
4.3.6. Spectra Treatment	107
4.3.7. Data Analysis	108
4.4. Results and Discussion	108
4.4.1. Strains Spectra	108
4.4.2. Microalgal Spectra Treatments	109
4.4.3. Axenic Strains (Treatment A)	111
4.4.4. Microalgae and Bacteria 1 Cocultured (Treatment B1)	112
4.4.5. Microalgae and Bacteria 2 Cocultured (Treatment B2)	113
4.4.6. Spectra Heatmap and Clustering	115
4.4.7. Microorganisms Interactions	117
4.5. Conclusions	118
4.6. Acknowledgements	119
4.7. Supplementary Materials	120
4.8. References	139
5 Discussão Geral	143
5.1. Referências	145
6 Conclusões	147

1 INTRODUÇÃO

1.1. Quem são as “Algas”?

A origem da palavra **alga** é incerta. Sabe-se, que na língua latina, era utilizada pelos romanos para referirem-se às “plantas marinhas”. Em 1735, Lineu publicou a primeira edição da obra “*Systema Naturae*”, uma das bases da classificação biológica atual. Neste sistema, aplicou o termo latino, no plural, na denominação da ordem “*Algae*”, inclusa na classe “*Cryptogamia*” do reino “*Vegetabile*”. No entanto, nos códigos de nomenclatura vigentes, não há nenhum grupo taxonômico com esse nome. Por que “alga” não é mais utilizado na classificação?

Na verdade, a palavra alga é amplamente utilizada, inclusive no meio acadêmico científico. Popularmente, o termo é empregado para designar quaisquer organismos fotossintetizantes que não sejam plantas. Porém, formalmente, a situação é mais complexa, sendo que não existe um consenso sobre a melhor definição.

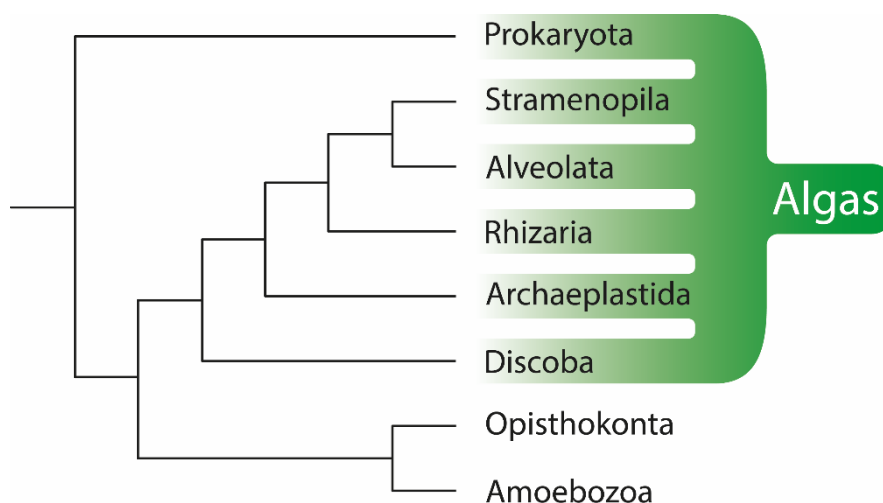
No livro intitulado “*Algae – an introduction to phycology*”, uma das principais referências sobre o assunto na literatura, os autores definem as algas como “plantas fotossintéticas muito diversas que não possuem raízes nem brotos foliares e que não apresentam tecidos vasculares” (tradução livre) (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1996). Com essa definição os musgos (Divisão Bryophyta) ficam inclusos nesse grupo. Assim, neste texto utilizaremos o termo “alga” para nos referirmos aos **organismos fotossintetizantes oxigênicos que não são plantas terrestres embriófitas** (BOROWITZKA; BEARDALL; RAVEN, 2016; CAVALIER-SMITH, 2007, 2016).

Essa definição ainda compreende um grupo bastante heterogêneo e abrange desde organismos unicelulares microscópicos até organismos multicelulares com mais de 60 metros de comprimento; bem como organismos procariontes (cianobactérias) e eucariontes; autótrofos, heterótrofos¹ e mixotróficos (BRODIE; LEWIS, 2007). Embora alguns autores não considerem que tal termo inclua as cianobactérias, podemos afirmar que elas possuem seu lugar junto aos organismos denominados “algas” (DELWICHE, 2007). A definição adotada neste texto, inclui também as cianobactérias.

¹ Gênero *Prototheca*, por exemplo

A utilização destas definições, incluindo a proposta por Cavalier-Smith, implica em agrupamentos artificiais, ou seja, que abrangem organismos que não são filogeneticamente próximos (**Figura 1.1**). Além disso, exclui desse agrupamento organismos que são filogeneticamente próximos, fazendo com que seja um grupo polifilético. Apesar dos problemas taxonômicos e filogenéticos, a utilização do termo sustenta-se pelo seu sentido ecológico.

Figura 1.1. Hipótese filogenética simplificada (adaptado de BALDAUF; ROMERALO; CARR, 2013 e ZMASEK; GODZIK, 2012) da classificação com 8 grupos, sendo que 6 destes incluem organismos que são comumente chamados de “algas”.

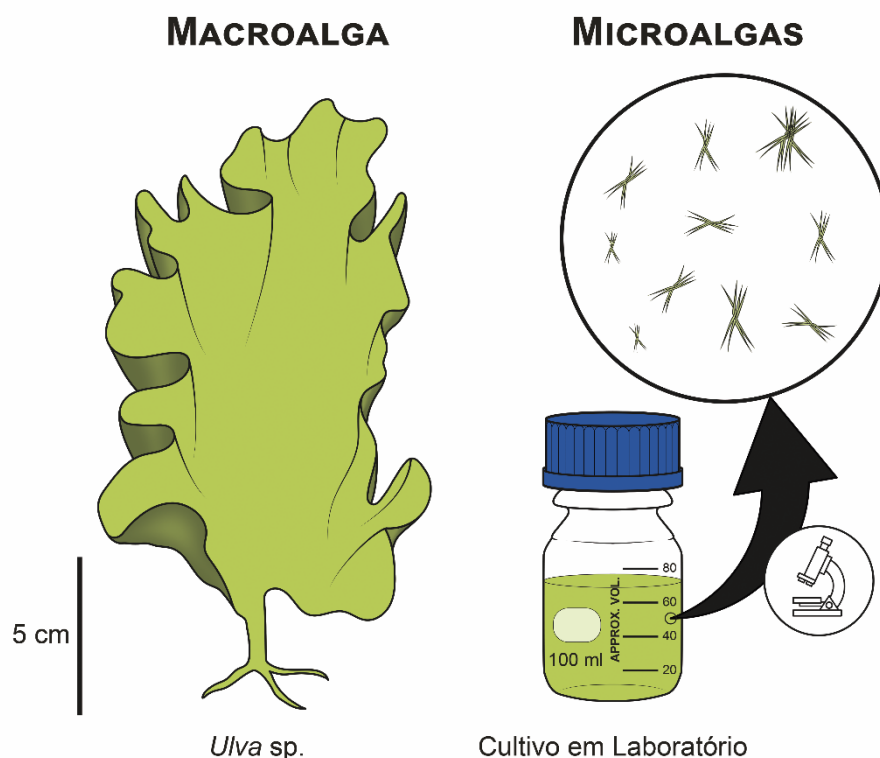


São organismos majoritariamente aquáticos e que realizam fotossíntese oxigênica. Assim, podemos entender as algas como organismos que desempenham um nicho ecológico semelhante. São os principais produtores nos ecossistemas aquáticos, constituindo a maior parte da base das cadeias alimentares destes ambientes (WHITTAKER; LIKENS; LIETH, 1975a).

O ramo da biologia dedicado ao estudo desses organismos é conhecido como Ficologia (do grego *φύκος*, *fýkos*, que significa alga) ou Algologia (do latim *alga*), é a área de estudo que abrange a maior quantidade de grupos filogenéticos diferentes. Entretanto, segue como um ramo bem consolidado da ciência, uma vez que a coesão ecológica que forma o grupo permite a aplicação de métodos de coleta, cultivo, preservação e estudo semelhantes (OLIVEIRA, 2005).

Há ainda uma distinção prática das algas, que baseada em seu tamanho. Usualmente, as algas multicelulares não microscópicas são chamadas macroalgas, sendo que então, as não visíveis (individualmente) a olho nu, são denominadas **microalgas**, que por sua vez, são em geral, organismos unicelulares e/ou coloniais (**Figura 1.2**).

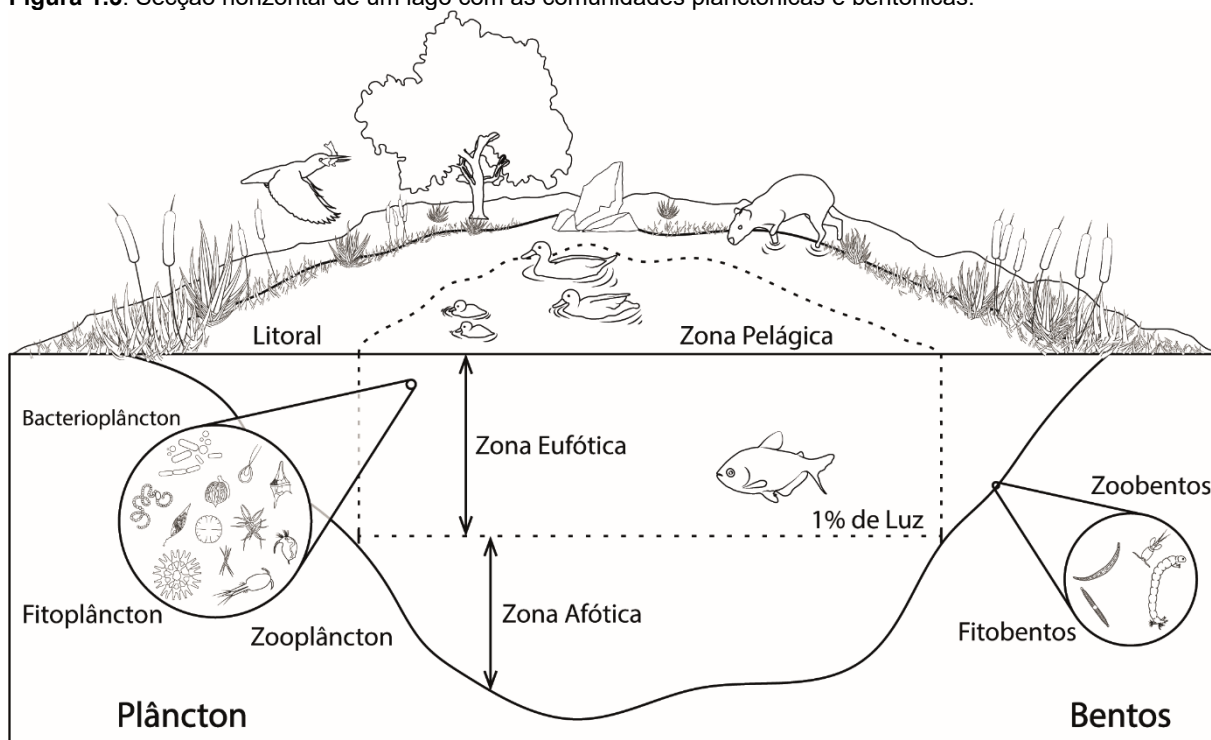
Figura 1.2. Exemplo de comparação do tamanho de uma macroalga com as microalgas.



A comunidade de organismos que vive à deriva na coluna d'água constitui o que denominamos como plâncton. Esse conjunto de organismos é composto por dois grandes grupos: os seres heterotróficos e os autotróficos, sendo chamados de zooplâncton e **fitoplâncton** (REYNOLDS, 2006), respectivamente (**Figura 1.3**). Os organismos que habitam o substrato dos ambientes aquáticos compõem a comunidade bentônica, também composta por indivíduos heterótrofos (zoobentos) e autótrofos (fitobentos). Estas duas comunidades produtoras (fitoplâncton e fitobentos) são compostas por microalgas, e se encontram nas zonas em que há incidência de luz (zona eufótica).

São organismos encontrados em virtualmente qualquer ambiente, possuindo representantes em todos os continentes e oceanos. Apresentam famílias, como as Selenastraceae (KRIENITZ *et al.*, 2016) e espécies, como *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae), que são consideradas cosmopolitas. Essa última, é uma microalga de água doce utilizada comercialmente que já foi isolada em todos os continentes com exceção da Antártida (CHISTI, 2018).

Figura 1.3. Secção horizontal de um lago com as comunidades planctônicas e bentônicas.



O número exato de espécies permanece desconhecido. A maior base de dados sobre algas, “*AlgaeBase*” <<https://www.algaebase.org/>> (GUIRY; GUIRY, 2023), conta atualmente (em agosto de 2023) com 172.236 nomes de espécies e variedades. Estimativas acerca desse número variam de 45.000 a mais de 100.000 (CHISTI, 2018; GUIRY, 2012); mais de 350.000 (BRODIE, 2007); de 200.000 até alguns milhões (AZEVEDO *et al.*, 2018). Essa grande variação das estimativas da quantidade de espécies está relacionada a fatores como sua grande abundância, diversidade e plasticidade; dificuldade na delimitação específica do grupo; e ser uma área de estudo que ganhou maior atenção somente recentemente.

1.2. O estudo das microalgas

A percepção da população sobre as algas, em geral, não é boa. Na língua inglesa, por exemplo, podemos encontrar alguns nomes populares para estes organismos como: *pond scum*, *seaweeds* e *frog spittle*, que, em tradução livre, podem ser entendidos como espuma de lago, mato marinho e saliva de sapo, respectivamente (CHAPMAN, 2013). De fato, a maior parte das pessoas associam estes organismos a situações desagradáveis como o crescimento de microalgas em suas piscinas, ambientes eutrofizados como lagos, rios e regiões costeiras (locais que posteriormente apresentam fortes odores, decorrentes da decomposição anaeróbia),

florações algais nocivas (FANs em português ou HABs em inglês), contaminações de culturas de mariscos por toxinas algais (CHAPMAN, 2013; CHISTI, 2018) e até mesmo como “sujeira” nas praias.

O poeta romano Virgílio cunhou a frase “*Vilior Algae*” em 30 AEC, que pode ser traduzida como “mais vil ou inútil do que as algas” (LEVINE; FLEURENCE, 2018). Contudo, estas ideias não fazem jus à real importância das algas. Humanos utilizam macroalgas como comida, medicamentos, fertilizantes e cosméticos desde 2700 AEC (CHISTI, 2018). Existem ainda registros da utilização de microalgas que remontam há 1000 anos na Ásia e 700 anos pelos astecas (LEVINE; FLEURENCE, 2018), assim como a ingestão de cianobactérias, incluindo gêneros como *Nostoc*, *Spirulina* e *Aphanizomenon*, em locais com crescimento algal suficientemente grande. Estes locais incluem algumas regiões do Oceano Pacífico e grandes lagos da África, América do Norte e América do Sul (JENSEN, 2001; SPOLAORE *et al.*, 2006).

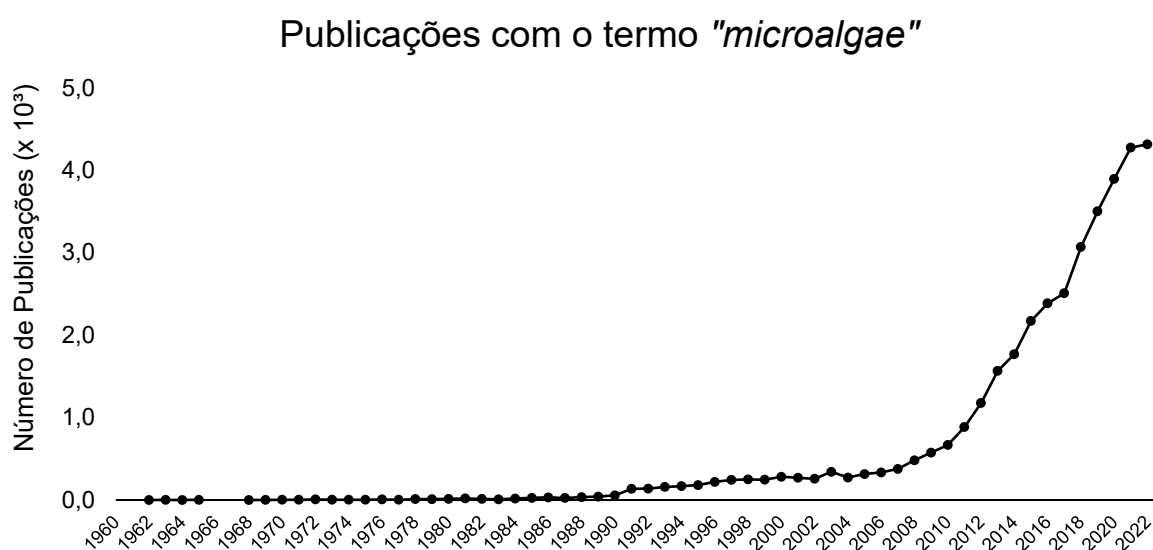
Apesar disso, o comércio e cultivo de microalgas é relativamente recente (ANDERSEN, 2005; BOROWITZKA, 1999; CHISTI, 2018; SPOLAORE *et al.*, 2006). O primeiro cultivo de algas, realizado com uma solução de sais inorgânicos, foi feito em 1871, pelo botânico-fisiologista Famintzin, em São Petersburgo (ANDERSEN, 2005). Já o primeiro registro de um cultivo de algas puro, ocorreu somente quase 20 anos depois. Esse é atribuído ao microbiologista holandês Beijerinck, em 1890, que isolou células vivas de algas dos gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus*, em cultivos livres de outros microrganismos, condição chamada axênica (ANDERSEN, 2005; BOROWITZKA, 1999).

Os primeiros cultivos de microalgas em massa, vieram a ser realizados somente em meados do século XX, principalmente em locais como Stanford (EUA), Essen (Alemanha) e Tóquio (Japão) (ANDERSEN, 2005; BOROWITZKA, 1999). Então, em 1953, é lançada a primeira edição do clássico livro “*Algae Culture: From Laboratory to Pilot Plant*”, editado por John S. Burlew, que reúne muitos destes estudos pioneiros. Entretanto, o interesse em pesquisar estes microrganismos ainda levou algumas décadas apresentar um crescimento significativo.

A pesquisa com o termo “*microalgae*”, na base de dados *Web of Science*, para estudos publicados de 1945 até 2000, retorna 2.384 resultados, enquanto para publicações a partir do ano 2001 são encontrados 34.424 resultados (**Figura 1.4**). Isso significa que, nos últimos 22 anos, o número de estudos publicados com microalgas, foi aproximadamente 15 vezes maior que a soma das publicações de cinco décadas

e meia. Até o início do século XXI foram publicados, em média, 43 artigos por ano, ao passo que após este período, o número médio de publicações anuais sobre este tema subiu para 1610 (valores aproximados). Até a metade do ano de 2023, período em que esses dados foram coletados, o número de publicações encontradas foi de 1550, próximo do valor médio de publicações por ano, mas em um período de apenas 6 meses.

Figura 1.4. Número de publicações contendo o termo "*microalgae*" indexadas na base de dados Web of Science por ano. A base de dados utilizada contém registros de publicações a partir do ano de 1945, no entanto a primeira publicação com o termo pesquisado aparece somente em 1962. Os anos sem marcações (1966 e 1967) na série correspondem a 0 registros de publicações.



O aumento significativo da quantidade de estudos desenvolvidos, com estes microrganismos, está possivelmente relacionado ao desenvolvimento de novos conhecimentos, técnicas e equipamentos, que possibilitaram maior conhecimento da sua diversidade e a exploração de seu potencial biotecnológico.

1.3. Importâncias das microalgas

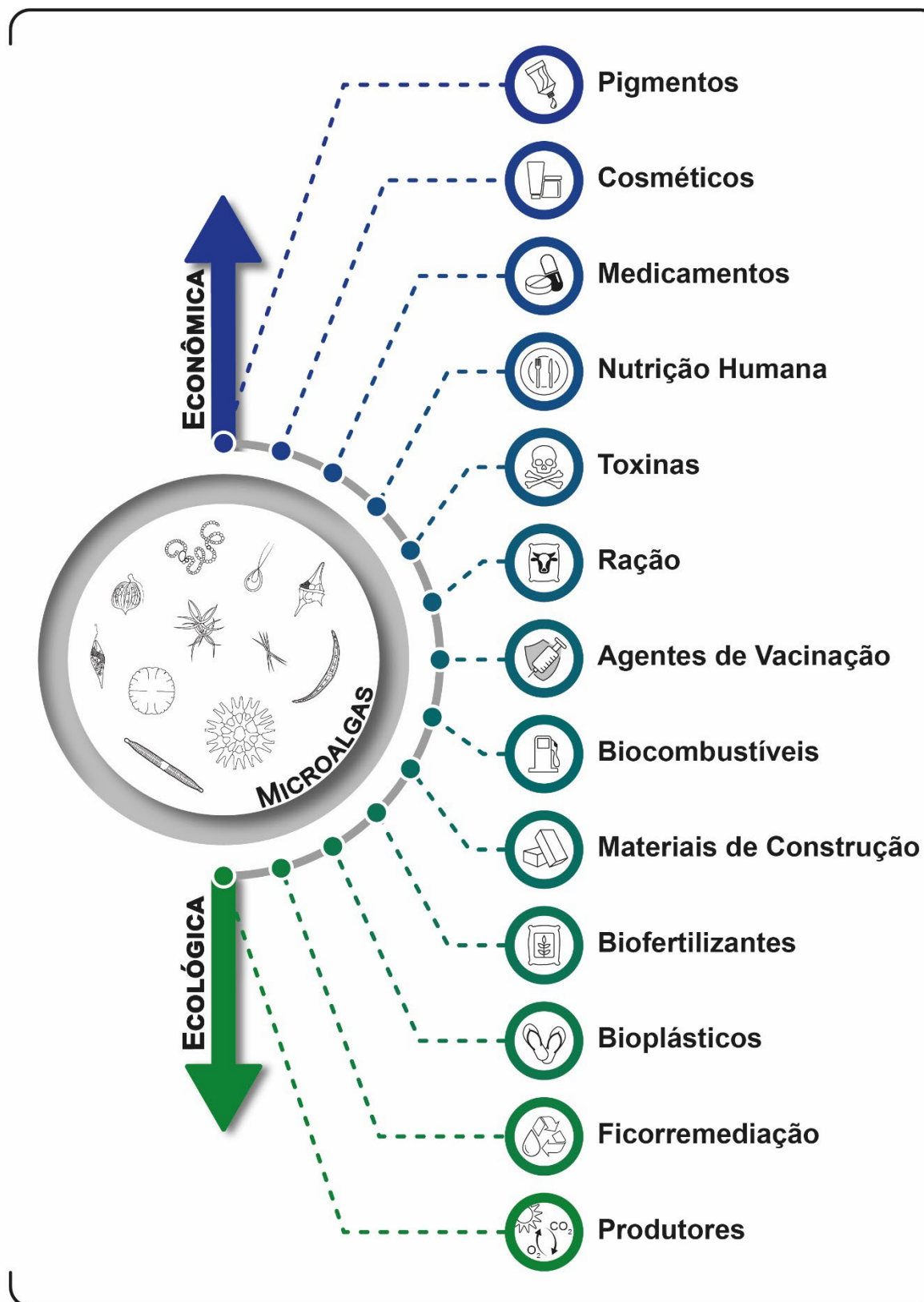
O interesse acadêmico nas microalgas é recente. Entretanto, dependemos destes organismos há muito mais tempo, talvez desde sempre. Chisti (2018) afirma que “as algas são, possivelmente, a razão histórica de nossa existência, e permanecem sendo vitais para nossa sobrevivência” (tradução livre). O potencial econômico do grupo é imenso e amplamente discutido na literatura, contudo, a importância destes organismos é bem mais extensa do que somente sua aplicação biotecnológica.

O principal processo de produção de matéria orgânica, a partir de matéria inorgânica, na biosfera é a fotossíntese oxigênica (WHITTAKER; LIKENS; LIETH, 1975a). Esse processo é também o responsável pela produção do oxigênio que respiramos e foi o surgimento das “algas” procarióticas (cianobactérias) que transformou a atmosfera terrestre com a produção de oxigênio, possibilitando também a formação da camada de ozônio (GRAHAM *et al.*, 2016). Nos ambientes terrestres os principais produtores primários, ou seja, que fazem fotossíntese oxigênica produzindo matéria orgânica e oxigênio, são as plantas embriófitas, e em ambientes aquáticos a produtividade primária é realizada, principalmente, pelo fitoplâncton (WHITTAKER; LIKENS; LIETH, 1975b). É bem estabelecido entre a comunidade científica, que as plantas terrestres atuais são descendentes de linhagens ancestrais de algas verdes. Assim, em última instância, praticamente toda a produção de matéria orgânica e gás oxigênio em nosso planeta deve-se às algas (CHAPMAN, 2013).

Portanto, as algas possuem posição de merecido destaque tanto no âmbito econômico quanto ecológico. Embora as importâncias econômicas e ecológicas sejam muitas vezes avaliadas separadamente e com ênfase na primeira, a realidade é que não podemos, e nem devemos separá-las, uma vez que são mutuamente dependentes (**Figura 1.5**). Algumas das aplicações econômicas dos produtos derivados das algas são motivadas por questões ecológicas, como no caso dos biocombustíveis, que atuam como uma fonte alternativa e renovável de energia, auxiliando ao mesmo tempo a mitigar a excessiva liberação de gás carbônico proveniente da queima dos combustíveis fósseis. Ao final, essa importância ecológica é também econômica, porque visa mitigar os efeitos adversos das mudanças climáticas na saúde humana, na produção de alimentos e nos desastres ambientais (NORDHAUS, 2019).

O conhecimento acerca das aplicações de produtos metabólicos das microalgas não é exatamente novo. Trabalhos de pesquisa e desenvolvimento nesta área datam desde a década de 1940. No entanto, Beneman *et al.* constata, em 1987, que mesmo com os grandes investimentos privados e governamentais, as possibilidades de aplicações práticas são poucas, e ainda menor é a quantidade de produtos comerciais. Esse potencial biotecnológico permaneceu subexplorado até recentemente (SKULBERG, 2000).

Figura 1.5. Exemplos de importâncias e aplicações de Microalgas, tanto em aspectos econômicos quanto ecológicos.



O desenvolvimento de técnicas, que viabilizaram a obtenção destes compostos de maneira rentável, deu origem a um mercado global de produtos microalgais, com valor estimado de 32,60 bilhões de dólares em 2017, sendo que a projeção para 2026 é de 53,43 bilhões de dólares (ALAM; XU; WANG, 2020). Uma destas estratégias é conhecida como biorrefinaria, em que é possível a obtenção de mais de um tipo de produto a partir de um mesmo cultivo de microalgas (TRIVEDI *et al.*, 2015).

A ampla diversidade deste grupo de organismos relaciona-se com a grande quantidade de suas possíveis aplicações, que variam desde a detecção de reservas de petróleo à obtenção de produtos, como por exemplo, pigmentos e corantes (NWOBA *et al.*, 2020), rações (NAGARAJAN *et al.*, 2021), medicamentos (BUX; CHISTI, 2016; ERIKSEN, 2008), cosméticos (PRIYADARSHANI; RATH, 2012; WANG *et al.*, 2015; YANG *et al.*, 2013), alimentos (YANG *et al.*, 2013) e biocombustíveis (BUX, 2013; KRIENITZ *et al.*, 2016; MENEZES *et al.*, 2013; YEE, 2016).

Os corantes e pigmentos são amplamente utilizados nas indústrias alimentícia, têxtil, gráfica e farmacêutica (medicamentos e cosméticos). Estes compostos podem ser de origem sintética (derivados de petróleo, ácidos orgânicos e compostos inorgânicos) ou naturais. A demanda por corantes de origens naturais, para produtos nutricionais, aumentou significativamente nos últimos anos devido à preocupação com distúrbios de saúde associados aos corantes artificiais (NWOBA *et al.*, 2020).

As microalgas atraíram grande interesse como produtoras destes compostos, pois, em comparação às outras fontes, apresentam cultivo simples, alta razão de produtividade por área, crescimento rápido e ampla variedade de pigmentos. Esses apresentam diversas tonalidades e atividades biológicas, e incluem clorofilas, carotenoides, xantofilas e ficobiliproteínas (NWOBA *et al.*, 2020; SOARES *et al.*, 2016). Entre os pigmentos mais procurados para fins comerciais estão: ficocianina, ficoeritrina, aloficocianina, astaxantina, α -, β - e γ -caroteno, luteína, licopeno, violaxantina, clorofila *a* e cantaxantina. Muitos destes pigmentos podem ser encontrados em maiores concentrações nas microalgas do que em plantas vasculares, ou são exclusivos destes organismos (como por exemplo, ficobiliproteínas e fucoxantina) (NWOBA *et al.*, 2020).

Sob condições naturais, as microalgas produzem, em concentrações razoáveis, somente clorofilas (LI *et al.*, 2008; WANG; CHEN, 2008). Entretanto, alguns

pigmentos de alto valor comercial, como β -caroteno, astaxantina e c-ficocianina, já são obtidos em larga escala a partir de cultivos das microalgas *Dunaliella salina*, *Haematococcus pluvialis* e *Arthrospira platensis*, respectivamente (BOROWITZKA; BEARDALL; RAVEN, 2016; NWOBA *et al.*, 2020).

Os carotenoides apresentam eficiente atividade antioxidante, compondo parte do sistema de defesa contra danos oxidativos em animais (STAHL; SIES, 2003). Contudo, esses organismos, em sua imensa maioria, não são capazes de sintetizar novas moléculas destes compostos (MAOKA, 2020). Dessa forma, sua obtenção se dá, principalmente, através das cadeias alimentares.

Em humanos, tal atividade confere proteção contra lesões causadas pela radiação ultravioleta e câncer de pele (STAHL *et al.*, 2000; ZERRES; STAHL, 2020), sendo que tais efeitos podem ser obtidos através de suplementação nutricional (SIES; STAHL, 2004; STAHL; SIES, 2003, 2012). Stahl *et al.* (2000) demonstraram um aumento nos níveis de carotenoides, na pele humana, através da ingestão de β -caroteno extraído da microalga *Dunaliella salina*, e subsequente redução dos níveis após o final do tratamento. Além das queimaduras (*erythema solare*) e do fator carcinogênico, a fotoxidação causada pela luz solar possui um papel central nos processos de diversas desordens fotossensitivas e de envelhecimento prematuro (SIES; STAHL, 2004).

O interesse em qualquer produto que promova melhoras na qualidade de vida é crescente, especialmente os que são naturais e de origem vegetal (PEREIRA, 2018). Os produtos que atuam nas camadas superficiais da pele (epiderme), sem afetar seu estado fisiológico, são conhecidos como cosméticos. Já os produtos conhecidos como cosmecêuticos atuam, através de compostos bioativos, promovendo reparações naturalmente dinâmicas (GULERI; TIWARI, 2020), como no caso dos antioxidantes, anteriormente citados.

Compostos de origem algal, como carrageninas e alginatos, são fundamentais para a produção de cosmecêuticos, e juntos correspondem a até 40% do mercado mundial de hidrocoloides (GULERI; TIWARI, 2020). Apesar de ainda existirem algumas dificuldades técnicas a serem superadas, os compostos bioativos produzidos por microalgas apresentam grande potencial de aplicação nesta esfera (MA; LAM; ZAIDAH, 2015).

Zanella & Alam (2020) publicaram um capítulo de livro dedicado somente aos compostos bioativos produzidos por microalgas (*sensu stricto*, ou seja, não incluem

aqui as cianobactérias). Os autores relatam a atividade de extratos algais, tanto na epiderme, quanto na derme. Na camada superficial, foram identificados compostos que: atuam na diferenciação celular epidérmica, afetando a maciez e suavidade da pele; estimulam a produção de proteínas de proteção contra radiação UVB; absorvem diretamente a radiação ultravioleta (entre 309 e 360 nm), promovendo proteção contra uma parte dos raios solares.

Já na camada mais profunda da pele, a derme, a atividade dos extratos algais chamam ainda mais a atenção da indústria cosmética. Isso se deve ao fato, de que é nessa camada, que estão os principais fatores que determinam as propriedades de tração e maciez da pele, afetando diretamente a sua flacidez (WALLER; MAIBACH, 2006). Fatores fisiológicos, associados ao envelhecimento, e fatores ambientais provocam uma perda quantitativa e qualitativa de colágeno, provocando o surgimento de rugas.

Um dos fatores ambientais relacionados a isso é o estresse oxidativo induzido pela radiação solar. Nesses casos já são conhecidas as atividades de compostos antioxidantes, citados anteriormente. Contudo, os extratos microalgais exibem ainda propriedades que promovem estímulos de produção de colágenos, tanto em culturas de células (*in vitro*) como em testes clínicos (*in vivo*) (MORVAN; VALLEE, 2007).

As microalgas também são os principais produtores primários de ácidos graxos polinsaturados (comumente identificados pelo acrônimo em inglês PUFA) (KHOZIN-GOLDBERG; ISKANDAROV; COHEN, 2011; MISHRA; MISHRA, 2018; ZANELLA; ALAM, 2020). Em nossa pele, esses compostos, afetam a atividade de enzimas que estão envolvidas na produção de melanina. Na literatura, encontramos tanto relatos de atividade inibidora, ou seja, promovendo o clareamento da pele (HERRMANN *et al.*, 2012b; LEE *et al.*, 2018; LETSIU *et al.*, 2017; PERTILE *et al.*, 2016) quanto de atividade estimuladora, ou seja, promovendo o escurecimento da pele (ANDO *et al.*, 1998, 1999; HERRMANN *et al.*, 2012a).

Alguns estudos preliminares (HERRMANN *et al.*, 2012b; JUNG *et al.*, 2018), em culturas de células humanas, indicam ainda o possível potencial de extratos algais como estimuladores para crescimento capilar (HERRMANN *et al.*, 2019).

Exemplos de espécies de microalgas com aplicações na produção de cosmecêuticos incluem: *Chlorella vulgaris*, *Dunaliella salina*, *Haematococcus lacustris* (as *Haematococcus pluvialis*), *Rhodella* spp.

Podem ainda ser utilizadas como agentes hidratantes (GULERI; TIWARI, 2020), cicatrizantes e bactericidas (GULERI; TIWARI, 2020), anti-inflamatórios (ZANELLA; ALAM, 2020). Como os cosmecêuticos são compostos por componentes bioativos, sua atuação acaba se assemelhando à cosméticos e medicamentos simultaneamente (GULERI; TIWARI, 2020). No entanto, os compostos bioativos extraídos das algas não apresentam atividades restritas à nossa pele e/ou com funções cosméticas.

Impactos significativos na saúde humana podem ser obtidos a partir de compostos produzidos pelas microalgas. Elas representam a fonte de compostos bioativos menos explorada por nós (MISHRA *et al.*, 2021). Suas ações vêm sendo estudadas para a utilização no tratamento de diversas doenças, que variam de doenças transmissíveis a condições crônicas que afetam a população humana (BASHEER *et al.*, 2020).

As doenças transmissíveis são aquelas causadas por organismos parasitas que se hospedam em nossos corpos, ocasionando prejuízos à nossa saúde. Essas podem ser provocadas por vírus, bactérias, protozoários, fungos e vermes, por exemplo. Compostos bioativos que inibem o crescimento de representantes de cada um desses grupos já foram encontrados em microalgas (BRATCHKOVA; KROUMOV, 2020; HASSAN *et al.*, 2022; IBRAHIM *et al.*, 2023; KESHRI, 2012), sendo que as *Cyanobacteria* e as classes *Chlorophyceae* e *Bacillariophyceae* são as que apresentam maior atividade antimicrobiana (KIRAN; VENKATA MOHAN, 2021). Os gêneros mais estudados quanto a estas aplicações incluem *Spirulina* (*Arthrospira*), *Nostoc*, *Chlorella*, *Haematococcus*, *Scenedesmus* e *Dunaliella*.

As microalgas são os organismos com, possivelmente, nosso maior interesse para a produção de compostos antivirais de origem natural (CARBONE *et al.*, 2021). Ohta *et al.* (1998) demonstraram que algumas espécies do gênero *Dunaliella* produzem compostos com alta atividade antiviral contra o vírus do herpes simples (HSV), inativando a infecção logo no primeiro estágio. Todas as lectinas (um tipo de proteína) produzidas por microalgas, e que apresentam atividade antiviral, são produzidas por cianobactérias, sendo que todas apresentam atividade contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV) (CARBONE *et al.*, 2021). Existem ainda, polissacarídeos sulfatados e fitoesteróis que também apresentam atividade antiviral, assim como outras proteínas, testadas *in-vitro* contra vírus da influenza, sarampo e ebola (IBRAHIM *et al.*, 2023).

Um dos primeiros compostos com atividade antibacteriana conhecidos (em inglês *chlorellin*) foi isolado, em 1944, de uma microalga do gênero *Chlorella* (BRATCHKOVA; KROUMOV, 2020; PRATT *et al.*, 1944). Ácidos graxos, produzidos por microalgas, apresentam atividade inibitória para diversas bactérias patogênicas para humanos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium* e *Vibrio cholerae*, por exemplo (KIRAN; VENKATA MOHAN, 2021). Também foram identificados compostos bioativos produzidos por *Haematococcus pluvialis* e *Scenedesmus obliquus* com atividades sobre *Escherichia coli* (gram negativa) e *Staphylococcus aureus* (gram positiva), respectivamente (MARREZ *et al.*, 2019; RODRÍGUEZ-MEIZOSO *et al.*, 2010).

Doenças causadas por protozoários afetam principalmente as regiões tropicais do planeta, acometendo assim, em sua grande maioria, as pessoas mais pobres. O desenvolvimento de medicamentos que combatem este tipo de parasita é um desafio, uma vez que possuem estrutura celular semelhante às células do hospedeiro, quando comparamos com outros parasitas como vírus e bactérias. Assim, compostos que são tóxicos para estes organismos acabam também sendo tóxicos para o hospedeiro. Nesse contexto, a diversidade fisiológica das microalgas novamente pode se mostrar como uma alternativa na busca de compostos bioativos com eficácia antiprotozoários (BRATCHKOVA; KROUMOV, 2020; TORRES *et al.*, 2014).

Metabólitos provenientes de cianobactérias mostraram atividade contra os causadores de importantes doenças como Malária (*Plasmodium falciparum*), Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e Leishmaniose (*Leishmania donovani* e *Leishmania mexicana*) (HASSAN *et al.*, 2022). Um bioativo produzido pela espécie *Oscillatoria nigro-viridis*, denominado em inglês *Viridamides A*, mostrou atividade *in-vitro* contra *T. cruzi* e *L. mexicana* (SIMMONS *et al.*, 2008). Veas *et al.* (2020) extraíram compostos com atividade contra o causador da Doença de Chagas de quatro espécies diferentes de microalgas, com destaque para a atividade do extrato de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Extratos de *Arthrospira platensis* e *Dunaliella tertiolecta* também apresentaram resultados positivos, com baixa toxicidade e indução de resposta imune, para o tratamento de leishmaniose visceral em teste realizados *in-vitro* (VAITKEVICIUS-ANTÃO *et al.*, 2022). Um estudo com *Cladophora glomerata*

demonstrou que o extrato dessa alga foi capaz de reduzir o número de cistos de *Giardia lamblia*, causador da giardíase, em camundongos (FAYYAD *et al.*, 2022).

A utilização de macroalgas como vermífugo e anti-helmíntico é bastante antigo. Algas vermelhas são utilizadas a mais de mil anos de maneira eficiente contra um verme parasita conhecido como Digenea (KESHRI, 2012). Contudo, pouco se sabe sobre os bioativos produzidos pelas microalgas para esta finalidade. O extrato de *Cladophora crispata* mostrou atividade sobre *Echinococcus granulosus* (*Platyhelminthes*), causador da hidatidose, reduzindo o número e o peso de cistos do parasita em camundongos. Este efeito foi similar ao tratamento com o medicamento já amplamente utilizado albendazol (ATHBI; AL-MAYAH; KHALAF, 2014). Também foi identificado que um extrato de *Chlorella vulgaris* apresentou atividade contra *Steinernema feltiae* (*Nemathelminthes*), causando mortalidade completa do verme em uma concentração de 37,5 mg mL⁻¹ (ZIELINSKI *et al.*, 2020).

As infecções fúngicas em humanos são conhecidas por sua persistência. Estima-se que ao menos metade das mulheres já tenham sido acometidas por candidíase ao menos uma vez na vida (BRATCHKOVA; KROUMOV, 2020). Compostos fenólicos extraídos da cianobactéria *Nostoc muscorum* mostraram capacidade de inibir o crescimento de *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* (DE CANO *et al.*, 1990). Shishido *et al.* (2015) identificaram dois compostos, em inglês *scytophycins* e *hassallidins*, produzidos por sete cepas, pertencentes a 4 gêneros (*Anabaena*, *Fischerella*, *Scytonema* e *Nostoc*), com potencial antifúngico. Extratos de *Scenedesmus obliquus* em éter etílico mostraram atividade efetiva contra nove espécies de fungos micotoxigênicos, além de também apresentarem atividade contra seis cepas de bactérias patogênicas (MARREZ *et al.*, 2019). Foi verificada ainda atividade inibitória da formação de biofilmes de *Candida albicans* através da utilização de compostos, extraídos em etanol, produzidos pela cianobactéria de água doce *Oscillatoria tenuis* (DEEPA; THAJUDDIN, 2023). Trabalhos que exploram bioativos de microalgas contra fungos dermatófitos somam testes com ao menos 40 espécies de microalgas e 19 espécies de fungos, sendo que as diatomáceas e as cianobactérias são os grupos mais testados nesse aspecto (LAGE *et al.*, 2022).

Carbone *et al.* (2021) afirmam que a crise sanitária que nos foi imposta pela pandemia de Covid-19 evidenciou a necessidade de buscarmos novos antivirais. Contudo, também nos é evidente que essa necessidade se estende a compostos com atividade contra outros organismos patogênicos. A resistência microbiana aos

compostos já conhecidos é perceptível e a diversificação das formas de combate a estes parasitas não apresenta nenhum tipo de desvantagem.

Além dos bioativos com atividade direta sobre os causadores dessas doenças, também existem compostos com atividade imunomoduladora, ou seja, que são capazes de auxiliar o funcionamento do nosso sistema imunológico (IBRAHIM *et al.*, 2023; RICCIO; LAURITANO, 2019). Outra importante aplicação desses compostos está em seu potencial de utilização no tratamento de diversas condições crônicas e agudas não transmissíveis, devido às suas características antioxidantes, anti-inflamatórias e analgésicas (BASHEER *et al.*, 2020).

Um dos principais desafios da medicina, na atualidade, é o combate ao câncer. São mais de 200 tipos de tumores malignos e que estão entre as principais causas de morte no planeta (ABD EL-HACK *et al.*, 2019). Novamente, as substâncias produzidas pelas microalgas apresentam uma possibilidade de tratamento para este tipo de enfermidade (BRATCHKOVA; KROUMOV, 2020). Zhang *et al.* (2019) demonstraram efeitos notáveis, contra células de câncer de cólon, utilizando polissacarídeos excretados de *Scenedesmus* sp., *Chlorococcum* sp. e *Chlorella pyrenoidosa*.

Polissacarídeos sulfatados produzidos por *Chlamydomonas reinhardtii* também mostraram atividade anticâncer (KAMBLE *et al.*, 2018). Extratos de *Scenedesmus obliquus* também mostraram possuir atividade citotóxica contra três linhagens de células de diferentes tipos câncer: mama, cólon e fígado (MARREZ *et al.*, 2019). Atividade contra células de câncer de mama também foi detectada em um extrato de *Haematococcus pluvialis*, que não somente inibiu o crescimento e a invasão dessas células, como também as induziu à apoptose, ou seja, morte celular das células cancerígenas (ALATEYAH *et al.*, 2022).

Os estudos com metabólitos de microalgas, no tratamento de condições não transmissíveis, incluem ainda inflamação pulmonar (LEUNG *et al.*, 2013), rinite alérgica (MAO; WATER; GERSHWIN, 2005), doenças cardiovasculares (KU *et al.*, 2013), anemia (SELMİ *et al.*, 2011), hipertensão (BARKIA; SAARI; MANNING, 2019), controle da glicemia (EBRAHIMI-MAMEGHANI *et al.*, 2017), formação de coágulos (MOUSAVIAN *et al.*, 2022), arteriosclerose (CHEONG *et al.*, 2010), colite (COSKUN *et al.*, 2011), condições hepáticas (KU *et al.*, 2013), condições neurológicas (GALLEGO *et al.*, 2022; ROMAY *et al.*, 2003), doença de Alzheimer (OLASEHINDE; OLANIRAN; OKOH, 2017), artrite (RASOOL; SABINA; LAVANYA, 2006), intoxicação

por metais pesados (HOSEINI; KHOSRAVI-DARANI; MOZAFARI, 2013), ferimentos e queimaduras (BASHEER *et al.*, 2020).

Apesar da quantidade significativa de trabalhos com o potencial terapêutico de compostos bioativos de microalgas, este campo de estudo está em expansão recente. O tempo entre a descoberta inicial de um composto e sua aprovação por órgãos reguladores, passando por todos os testes necessários e exigidos, é de cerca de 15 anos. Estima-se que menos de 12% dos medicamentos potenciais cheguem à aprovação final (MARTÍNEZ ANDRADE *et al.*, 2018).

Muitas vezes, as aplicações de produtos microalgais como medicamentos se misturam à sua utilização como suplementos nutricionais. São os chamados nutracêuticos, ou seja, produtos alimentares que apresentam benefícios para a saúde humana maiores do que os alimentos convencionais. No entanto, eles também podem ser utilizados como aditivos à alimentos, fortalecendo os benefícios destes para a saúde humana, sendo que nesse caso são denominados alimentos funcionais (ISLAM; ALSENANI; SCHENK, 2017).

Nesse sentido, os gêneros *Chlorella* (Chlorophyta) e *Arthrospira/Spirulina* (Cyanobacteria) são os mais amplamente utilizados, correspondendo à 80% do mercado global de alimentos produzidos com microalgas (HACHICHA *et al.*, 2022). Entre os compostos, os PUFA são, possivelmente, os de maior destaque. Seus impactos na saúde humana são extensamente estudados (cosmecêuticos e nutracêuticos) e a utilização de peixes como fonte primária destas moléculas não é capaz de atender à demanda mundial. Atualmente já é possível a produção, em larga escala, de PUFA a partir de microalgas (DE MORAIS *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2022).

Além dos benefícios terapêuticos, a utilização de microalgas como fonte de nutrientes na alimentação humana é uma possibilidade a ser explorada. Elas são uma excelente fonte de vitaminas (A, B1, B2, B6, B12, C e E), minerais (Potássio, ferro, magnésio, cálcio e iodo), carboidratos, lipídios e possuem quantidades de proteínas similares às fontes tradicionais como leite, soja, ovo e carne (KOYANDE *et al.*, 2019). Em comparação à soja, por exemplo, as proteínas algais apresentam um perfil de aminoácidos de maior qualidade para a nutrição humana (FABRIS *et al.*, 2020). Outro aspecto relevante é que as microalgas apresentam uma digestibilidade adequada para o consumo humano (NICCOLAI *et al.*, 2019; SATHASIVAM *et al.*, 2019).

Algumas espécies de microalgas são certificadas como “geralmente reconhecido como seguro” (acrônimo em inglês GRAS) pela agência reguladora

estadunidense de administração de drogas e alimentos (acrônimo em inglês FDA). Essa classificação é aceita internacionalmente e inclui espécies da cianobactéria *Spirulina* sp. e de algas verdes *Chlorella* sp., *Chlamydomonas reinhardtii*, *Haematococcus* sp. e *Dunaliella* sp. (FABRIS *et al.*, 2020).

Como visto, são diversos os benefícios à saúde humana que são proporcionados por compostos de origem microalgal. Entretanto, a máxima “a dose é que faz o veneno”, escrita pelo médico suíço conhecido como Paracelso (1493/94 — 1541) (GANTENBEIN, 2017), é importante de ser levada em consideração. Obviamente o consumo excessivo desses compostos podem levar a danos à saúde. Ainda assim, existem compostos que mesmo em baixas concentrações podem provocar prejuízos, estes são tradicionalmente chamados de toxinas.

Compostos com atividade anticâncer, por exemplo, incluem moléculas com atividade citotóxica, sendo que poucos estudos focaram nos efeitos desses em células não cancerosas (NICCOLAI *et al.*, 2017). Os grupos de microalgas mais conhecidos pela produção de toxinas incluem os dinoflagelados, as diatomáceas e as cianobactérias, sendo esse último grupo o de principal preocupação em ambientes de água doce (CARUANA; AMZIL, 2018; LAGANÀ *et al.*, 2015).

Manning e Nobles (2017) relatam que são documentadas mais de 60 espécies de cianobactérias que são capazes de sintetizar cianotoxinas, e acredita-se que a maior parte delas, se não todas, apresentam algum nível de toxicidade. São metabólitos como microcistinas, nodularinas, saxitoxinas, anatoxinas, entre outros. A anatoxina-a, por exemplo, é um alcaloide neurotóxico que algumas espécies do gênero *Arthrospira* podem ser potenciais produtoras (GROSSHAGAUER; KRAEMER; SOMOZA, 2020).

Niccolai *et al.* (2017) realizaram testes de toxicidade *in vitro* em células humanas e *Artemia salina* (Crustacea) com 12 extratos microalgais. Metade dessas amostras apresentou algum nível de toxicidade nos testes. Sendo que a amostra com maior atividade tóxica foi a de um produto comercial (pó de Klamath) produzido com biomassa da cianobactéria *Aphanizomenon flos-aquae*.

No Brasil, temos como exemplo a tragédia que ocorreu em 1996 na cidade de Caruaru (Pernambuco), em que mais de 50 pessoas, em tratamento de hemodiálise, foram a óbito devido à contaminação com microcistina na água utilizada no procedimento. Existe ainda uma forte evidência de uma correlação entre florações

algais no reservatório de Itaparica (Bahia) e a intoxicação de 200 pessoas, levando a 88 mortes em 1988 (SANCHES *et al.*, 2012).

A capacidade de produzir toxinas pode ser um motivo de preocupação quanto à utilização das microalgas, especialmente quando envolvem nutrição. Contudo, o crescimento acadêmico desse campo nos proporciona uma visão ampla dos benefícios do uso desses organismos com segurança. No que diz respeito a questão da nutrição as microalgas também podem nos ajudar de modo indireto.

A produtividade de biomassa das algas é superior à das plantas terrestres. A planta terrestre cultivada de crescimento mais rápido, uma espécie de gramínea nativa da América do Norte, é capaz de absorver menos de 0,5% da energia solar que recebe. Estudos vêm demonstrando que as microalgas, por outro lado, são capazes de absorver entre 10–20%, ou mais. Estima-se que a produtividade das microalgas pode chegar a ser 50 vezes maior do que o cultivo terrestre mais rápido que temos (LI *et al.*, 2008b). Além disso elas não competem por recursos agrícolas, como terras aráveis, e consomem menos água do que os cultivos terrestres (CAMACHO; MACEDO; MALCATA, 2019; LI *et al.*, 2008b).

Possuindo uma composição química adequada à alimentação animal, representam uma ótima alternativa como insumos na produção de ração (DINESHBABU *et al.*, 2019). Na aquicultura (produção de moluscos, crustáceos, peixes etc.) a utilização de algas na alimentação já é realizada há décadas (FABRIS *et al.*, 2020). Na pecuária terrestre podem ser utilizadas no preparo de rações para aves, suínos, bovinos e ovinos, que correspondem às principais fontes de proteína animal na nutrição humana (NAGARAJAN *et al.*, 2021).

Além de fornecer matéria orgânica para a obtenção de energia nesses animais, os compostos bioativos das microalgas também promovem benefícios para as criações. Camacho *et al.* (2019) elaboraram uma tabela, com potenciais aplicações industriais de “rações funcionais”, em que listam 13 tipos diferentes de criações animais e seus benefícios. Elas podem ainda atuar como vetores de entrega de compostos específicos para estes animais.

Uma cepa de *Chlamydomonas reinhardtii*, modificada para produzir a proteína verde fluorescente (acrônimo em inglês GFP) em seus cloroplastos, foi utilizada na alimentação de peixe-zebra (*Danio rerio*). A posterior detecção dessa proteína nos tecidos dos peixes evidencia a possibilidade da utilização de microalgas como vetores de vacinas (KWON *et al.*, 2019). Em peixes, as vacinas orais apresentam vantagens

em relação à vacinação injetável, como menor demanda de mão-de-obra e custo, menos estresse para os animais e a possibilidade de aplicação em estágio juvenis (SIRIPORNADULSIL; DABROWSKI; SAYRE, 2007).

Para doenças que afetam os seres humanos, o primeiro registro de antígeno expresso utilizando microalgas como vetores é do capsídeo do vírus da doença mão-pé-boca. Atualmente, antígenos de outras doenças infecciosas também estão em fase de testes pré-clínicos, como malária, hepatite B e infecções por *Staphylococcus aureus*, vírus do papiloma humano (HPV) e vírus da imunodeficiência humana (HIV) (MA *et al.*, 2020).

A alta produtividade das microalgas também atrai a atenção como uma possibilidade para suprir a crescente demanda energética. O esgotamento das reservas de petróleo é iminente e as alterações climáticas já são uma realidade. Maneiras mais sustentáveis de produzir combustíveis precisam ser buscadas e incentivadas. A grande produção de biomassa, associada ao seu alto conteúdo de lipídios, proteínas e carboidratos das microalgas e a ausência de lignina, que é um composto indesejável nos processos de fermentação, atraem a atenção para sua utilização nesse campo (ADETUNJI *et al.*, 2023).

Diversas espécies e combinações de espécies, modificações por engenharia genética, técnicas de cultivo, parâmetros abióticos e técnicas de extração têm sido estudadas nos últimos anos a fim de viabilizar a produção em larga escala (PENG *et al.*, 2020). Os diferentes tipos de biocombustíveis que podem ser produzidos com a biomassa microalgal incluem biodiesel, biogás, bioetanol, bio-hidrogênio e outros. A possibilidade de realizar o cultivo delas em águas residuais, associada à extração de mais de um tipo de composto de interesse através da biorrefinaria, tornam essa atividade promissora tanto do ponto de vista econômico quanto ecológico (SATHYA *et al.*, 2023).

Um grupo de microalgas forma ainda compostos com uma aplicação inusitada, as diatomáceas. Elas possuem sua parede celular, chamada frústula, formada por uma estrutura silicosa (VAN DEN HOEK; MANN; JAHNS, 1996). A deposição destas cápsulas, após a morte das células, no fundo dos corpos d'água e oceanos dá origem a um material chamado diatomito. As propriedades desse material permitem diversas aplicações na construção.

A mistura do diatomito em uma liga asfáltica aumenta a resistência à deformação e altas temperaturas, bem como reduz rachaduras em baixas

temperaturas (CONG; CHEN; CHEN, 2012). Em uma mistura de diatomito (90%), cinza vulcânica (8%) e perborato de sódio (2%) temos um material de alta performance e baixo custo para controle de umidade (VU *et al.*, 2013). Misturado ao concreto promove o aumento da resistência à compressão (MACEDO *et al.*, 2019) e existe ainda um compósito, com diatomito em sua composição, que aprimora a fotodegradação de poluentes orgânicos (ZHAO *et al.*, 2018).

Na agricultura também existem aplicações das microalgas. A utilização de insumos inorgânicos possui alta demanda. Álvarez-González *et al.* (2022) relatam que, segundo a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (acrônimo em inglês FAO), em 2019 o consumo global de nitrogênio (N) foi de 62,7 kg a cada 10000 m² e de fósforo (P) foi de 21 kg para a mesma área. Além disso, estimam que 40% do nitrogênio fornecido é perdido e a eficiência do uso do fósforo mal chega a 20% (DE SIQUEIRA CASTRO *et al.*, 2020a).

A inoculação de um fertilizante feito com *Chlorella vulgaris* e *Spirulina platensis* mostrou ser capaz de promover um aumento significativo de Nitrogênio, Fósforo e Potássio disponível no solo, aprimorando a produção de arroz (DINESHKUMAR *et al.*, 2018). Uma mistura do fertilizante composto de superfosfato triplo (acrônimo em inglês TSP) com 12% de biomassa de microalgas, cultivadas em águas residuais, mostrou ter a mesma eficiência do TSP puro na adubação do milho (DE SIQUEIRA CASTRO *et al.*, 2020b). Hussain *et al.* (2021) citam estudos que obtiveram resultados positivos da utilização de biofertilizantes microalgais com tomate e trigo.

Uma biomassa microalgal, formada principalmente por *Scenedesmus*, mostrou ter o mesmo efeito de um fertilizante inorgânico no crescimento de plantas de manjerição (*Ocimum basilicum* L.). Sendo que, quando ministrado sozinho ou em conjunto com o fertilizante, ainda mostrou ter um efeito positivo sobre o peso seco das folhas (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ *et al.*, 2022). Ainda são necessários aprimoramentos relacionados às técnicas de produção destes insumos, a fim de que os impactos ambientais sejam menores, e o valor agregado a esses produtos seja maior, em todo o caso, os resultados obtidos até o presente são promissores.

Outro problema, em que as microalgas podem ser úteis, é a produção de plástico. Só em 2021 foram produzidas $3,9 \times 10^8$ toneladas de plástico no planeta (GARSIDE, 2023). A maior parte deste material, de consumo crescente, é produzido a partir de uma fonte não renovável e não é degradado no ambiente. Uma alternativa

a esses plásticos derivados de petróleo são os plásticos derivados de biomassa, chamados bioplásticos (RAHMAN; MILLER, 2017).

O uso de microalgas na produção de bioplásticos, atualmente, ocorre através de duas principais abordagens: I) compósitos de biomassa microalgal com outros plásticos; e II) cultivo de biopolímeros intracelulares (PARK; LEE, 2022). Zeller *et al.* (2013) demonstraram o potencial da produção de termoplástico com *Spirulina platensis* (I) e de bioplástico com biomassa de *Chlorella vulgaris* (II) para fins comerciais. A produção de termoplásticos a partir de combinações com populações fitoplanctônicas heterogêneas (II) e compósitos de PVC com *Chlorella* (I) também são descritas na literatura (FABRIS *et al.*, 2020), assim como a utilização de *Nannochloropsis salina* na produção de um biocompósito plástico para impressão 3D (KARTIK *et al.*, 2021).

A utilização de seres vivos para a remoção ou transformação de contaminantes do meio ambiente é chamada biorremediação. Quando os organismos em questão são algas e microalgas, esse processo é chamado ficorremediação (KOUL; SHARMA; SHAH, 2022). Suas aplicações envolvem a remoção de metais pesados e metaloides (PRADHAN *et al.*, 2022), resíduos farmacêuticos (JIMENEZ-BAMBAGUE *et al.*, 2021), corantes (AYELE *et al.*, 2021), pesticidas (KAWAHIGASHI, 2009; SINGH; SINGH, 2017), microplásticos (PRIYADHARSHINI *et al.*, 2021), assim como o tratamento de águas residuais de origem agrícola (GOSWAMI; AGRAWAL; VERMA, 2022; PHANG; CHU; RABIEI, 2015), industrial (KRISHNAMOORTHY; MANICKAM, 2021; SINGH; TIWARI; DAS, 2016) e doméstica (DEVI *et al.*, 2023). Uma das principais vantagens dessa técnica é que, além de ser financeiramente viável, a biomassa produzida pode conter compostos de interesse biotecnológico, como biocombustíveis, por exemplo (FURTADO *et al.*, 2023). Além disso, a utilização destes organismos no tratamento de águas residuais promove uma melhora na qualidade da água devolvida ao ambiente, uma vez que, além da remoção de substâncias prejudiciais, também promovem a oxigenação da água ao realizarem a fotossíntese (KOUL; SHARMA; SHAH, 2022).

Mais de 90% das publicações científicas com microalgas, encontradas na base de dados da *Web of Science*, são dos últimos 23 anos. Assim, é provável que novas aplicações ainda sejam descobertas nos próximos anos. Na área médica um gene de origem algal (MCCLEMENTS *et al.*, 2020) mostrou o potencial de restaurar parcialmente a visão de um paciente cego (SAHEL *et al.*, 2021); Bombelli *et al.* (2022)

utilizaram uma microalga para manter o funcionamento de um processador, por mais de seis meses, em um dispositivo do tamanho de uma pilha comum (AA); e até mesmo sua utilização como principais candidatas aos primeiros cultivos de um possível processo de colonização em Marte já vem sendo analisado (MAPSTONE *et al.*, 2022).

Esses são apenas alguns exemplos de investigações, algumas delas pioneiras, que podem abrir novas áreas completamente desconhecidas da aplicação das microalgas. Mal saberia o poeta Virgílio, isento da culpa por seu contexto histórico, que talvez sejamos nós todos “*vilor algae*”, não por demérito nosso, mas sim pela imensa habilidade e versatilidade das próprias algas.

1.4. Ecologia das microalgas

Microalgas é um “grupo” altamente diverso e que compreende diferentes organismos com linhagens evolutivas distintas, caracterizando assim um grupo não natural. No entanto, existe um motivo para ainda utilizarmos essa forma de nos referirmos a estes organismos: a ecologia. A principal característica ecológica que une esse “grupo” está no fato de serem produtores primários.

Friend *et al.* (2009) estimam que aproximadamente metade da produtividade primária global vem dos oceanos (48,9%). Essa estimativa baseia-se na produtividade fitoplanctônica, contudo, esses autores não deixam explícito se essa porcentagem inclui ambientes de água doce. Jassey *et al.* (2022) estimam que cerca de 6% da produtividade primária terrestre seja por ação de microalgas de solo. Dessa forma, nos parece seguro afirmar que as algas são responsáveis por mais da metade da produtividade primária do nosso planeta.

O metabolismo de todo ser vivo necessita de energia, e a principal fonte, comum a todos os organismos, são as moléculas orgânicas energéticas (PHILLIPSON, 1966). Essas, por sua vez, são produzidas pelos produtores (principalmente através da fotossíntese) ou são adquiridas, através do consumo, por aqueles que são incapazes de produzi-las. Portanto, as dinâmicas populacionais de qualquer ambiente dependem da comunidade produtora, que sustenta toda a cadeia alimentar (BEGON; COLIN; HARPER, 2007). Ainda que o consumo direto de algas e microalgas em nossa nutrição não seja tão comum, o consumo de alimentos como peixes e frutos do mar é bastante significativo em diversas populações humanas.

O principal processo de obtenção de energia, a partir dessas moléculas, ocorre através da oxidação delas. Isso significa que nossa dependência, enquanto

consumidores aeróbios, não está relacionada somente às moléculas orgânicas produzidas pelos produtores, mas também ao oxigênio liberado por eles no processo de fotossíntese. Além disso, esse processo consome gás carbônico (CO_2), fato especialmente relevante no atual cenário de aumento da concentração desse gás na atmosfera, provocado por nós, acarretando alterações climáticas.

Mesmo sendo organismos fundamentais aos ecossistemas aquáticos, eventos de grande crescimento populacional podem provocar desequilíbrios. As florações algais geralmente são ocasionadas por processos de poluição, que promovem um aumento da concentração de nutrientes inorgânicos na água, em um processo conhecido como eutrofização (BEGON; COLIN; HARPER, 2007). Esses eventos podem levar à depleção do oxigênio dissolvido na água, ocasionando mortandade em massa de organismos aquáticos e consequentemente aumento da decomposição anaeróbia, resultando na produção de gases com odores desagradáveis característicos destes ambientes afetados. Uma preocupação adicional destes eventos ocorre quando a floração é de uma espécie que produz substâncias tóxicas, gerando o que conhecemos por florações algais nocivas (MANNING; NOBLES, 2017).

Os resíduos de origem agrícola e industrial são as duas principais fontes de poluição da água (HUSSAIN *et al.*, 2021). O tratamento dessas águas residuais reduz a possibilidade de ocorrência destes eventos e, como discutido anteriormente, pode ser realizado através de cultivos microalgais, com o benefício da obtenção de biomassa algal para diversas aplicações.

Outro aspecto importante da ecologia desses organismos são as interações ecológicas que eles estabelecem. Essas relações incluem a predação (por peixes, animais filtradores, zooplâncton, entre outros), a competição com outras algas, o parasitismo por vírus, e interações com bactérias, sendo que nosso entendimento sobre esta última passou por significativas mudanças nos últimos anos (CIRRI; POHNERT, 2019).

As relações ecológicas entre as microalgas e as bactérias heterotróficas estão entre os mais relevantes dos ecossistemas aquáticos (SEYMOUR *et al.*, 2017). As interações entre esses dois grupos podem variar desde a cooperação até a competição. Pode haver competição, principalmente, por compostos inorgânicos, no entanto as bactérias obtêm grande parte de sua demanda de carbono orgânico diretamente do fitoplâncton e as microalgas envolvidas são beneficiadas através da

remineralização, que consiste na transformação de matéria orgânica em componentes inorgânicos (RAMANAN *et al.*, 2015; SEYMOUR *et al.*, 2017).

Essas interações ocorrem, principalmente, nas regiões próximas às células algais que estão sob influência dos compostos produzidos por elas. Esse espaço apresenta características tão distintas, em termos de micro-habitat, que passou a ser denominado como “focosfera” (BELL; MITCHELL, 1972), sendo definido com “uma zona que pode existir estendendo-se para fora a partir das células ou colônias algais por uma distância indefinida, em que o crescimento bacteriano é estimulado por produtos extracelulares da alga” (tradução livre). As bactérias associadas modificam constantemente a matéria orgânica excretada pelas microalgas, no entanto pouco se sabe sobre a influência que estas exercem no metabolismo intracelular das algas (BOROWITZKA, 2016).

Mudanças no fitoplâncton refletem em uma variação na comunidade bacteriana do ambiente. Isso decorre do fato diferentes táxons bacterianos se associam a diferentes táxons algais, havendo assim uma especificidade dessas relações (RAMANAN *et al.*, 2016). Além disso, sabe-se que quando em culturas, diferentes espécies de microalgas são colonizadas por comunidades bacterianas distintas (BAGATINI *et al.*, 2014; DZIALLAS; GROSSART, 2011; KOUZUMA; WATANABE, 2015). Os motivos dessa especificidade podem ser desde a capacidade diferenciada de degradação, das bactérias, daquilo que as algas excretam até a produção de antibióticos (GOUVÊA; VIEIRA; LOMBARDI, 2005; ØSTENSVIK *et al.*, 1998), ou excreção de outros compostos orgânicos pelo próprio fitoplâncton (BRUCKNER *et al.*, 2011), quando em presença de bactérias. Além disso, sabe-se que a presença das bactérias, devido à competição por nutrientes, pode alterar a estequiometria e morfologia (biovolume) do fitoplâncton (DANGER *et al.*, 2007). Apesar do conhecimento sobre a especificidade dessas relações, são escassas as informações sobre quão específicas são essas interações e de que forma a presença dessas bactérias modifica a morfologia, a fisiologia e a bioquímica das microalgas, especialmente daquelas proximamente relacionadas.

1.5. Identificação das microalgas

Há um provérbio chinês que diz “a primeira parte do conhecimento é saber os nomes certos” (tradução livre). Conhecer a identificação correta do objeto de estudo é fundamental em qualquer área da ciência. As aplicações biotecnológicas das

microalgas exigem um maior aprofundamento do atual conhecimento taxonômico do grupo. Isso ocorre pois, em geral, as microalgas apresentam uma morfologia bastante simples. Assim existem poucos caracteres morfológicos que possibilitem uma taxonomia morfológica robusta (KRIENITZ *et al.*, 2001; LEE *et al.*, 2015). Dessa forma, a integração de métodos taxonômicos complementares, como por exemplo a biologia molecular e a quimiotaxonomia, se faz crucial para refletir as relações taxonômicas do grupo (BARBANO *et al.*, 2015).

A análise de compostos produzidos pelas microalgas, como forma de classificar esses organismos (quimiotaxonomia) tem apresentado boa capacidade de resolução taxonômica, tanto com diferentes compostos como carboidratos (BAGATINI *et al.*, 2023; TAKEDA, 1991), lipídios (MORI *et al.*, 2018; VOLKMAN *et al.*, 1998), proteínas (EMAMI *et al.*, 2015) e carotenoides (PALIWAL *et al.*, 2016), quanto com diferentes técnicas de espectrometria e espectroscopia (DE MORAIS *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2017).

Diversas técnicas de espectrometria de massa, como cromatografia gasosa (CG-MS) e cromatografia líquida (LC-MS), por exemplo, são rotineiramente utilizadas em laboratórios para a identificação de compostos, que variam desde materiais sintéticos até amostras biológicas ambientais (GROSS, 2006). O princípio básico da espectrometria de massa envolve gerar íons a partir de compostos, orgânicos ou inorgânicos, e separá-los por sua razão massa carga (m/z) para detectar qualitativamente e quantitativamente as moléculas analisadas (DE HOFFMANN; STROOBANT, 2007). A diversidade de técnicas está relacionada aos diferentes tipos de ionização de moléculas conhecidos.

A espectrometria de massa por dessorção/ionização a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo (MALDI-TOF MS) é um tipo de ionização branda, permitindo a análise de moléculas com uma baixa taxa de fragmentação (GROSS, 2006). Devido a essa característica, essa técnica tem sido utilizada para a análise, principalmente, de proteínas, peptídeos e outras biomoléculas grandes (SIUZDAK, 1996). Além disso, a espectrometria de massa por MALDI-TOF é bastante prática quando comparada com outras técnicas de espectrometria, pois necessita de uma quantidade pequena de biomassa e permite a análise de até 384 amostras de modo automático.

Estudos quimiotaxonômicos têm evidenciado que a diversidade das microalgas pode ser maior do que o considerado atualmente, que é baseada,

principalmente, na morfologia (EMAMI *et al.*, 2015). Organismos que produzem conjuntos de compostos distintos podem ser morfologicamente semelhantes, levando à uma subestimação da diversidade do grupo (EMAMI *et al.*, 2015). Por outro lado, organismos pertencentes a uma mesma espécie podem produzir diferentes compostos, dependendo das condições ambientais (DORLING; MCAULEY; HODGE, 1997) e/ou das interações que estabelecem (PAUL; MAUSZ; POHNERT, 2013), por exemplo, o que pode resultar em uma superestimação da diversidade.

Essa superestimação pode ser contornada através do aprimoramento dos métodos de análise. A avaliação em diferentes condições de cultivo e diferentes interações interespecíficas pode revelar possíveis compostos que podem ser utilizados como marcadores, ou seja, compostos que não variam de acordo com a alteração do meio.

A ideia de uma abordagem taxonômica que integra essas diferentes metodologias pode ser denominada como taxonomia colaborativa (FISHER; SMITH, 2008), combinada (MALHOTRA; THORPE, 2004), integrativa (SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010), multidimensional (YODER *et al.*, 2005), multidisciplinar (SCHLICK-STEINER *et al.*, 2006) ou polifásica (VANDAMME *et al.*, 1996; VANDAMME; PEETERS, 2014). Ainda que a aplicação da taxonomia integrativa permita um melhor entendimento da diversidade das microalgas, a delimitação de espécies desse grupo ainda continua problemática. Isso ocorre devido ao fato de que a forma predominante de reprodução desses organismos é assexuada, e para algumas, como microalgas verdes cocoides da Família Selenastraceae, a reprodução sexuada é desconhecida (KRIENITZ *et al.*, 2001). Isso impossibilita a utilização do Conceito Biológico de Espécie, que considera que indivíduos pertencem a uma mesma espécie quando a reprodução sexuada ocorre em ambiente natural e gera descendentes férteis (DE QUEIROZ, 2007). Mesmo a utilização de marcadores moleculares, que têm revolucionado a taxonomia de microalgas verdes (e.g. GARCIA DA SILVA *et al.*, 2017; KRIENITZ *et al.*, 2011; VIEIRA *et al.*, 2016), ainda se apresenta confusa ou insuficiente para a delimitação de espécies em microalgas (e.g. MALAVASI *et al.*, 2016).

Assim, a delimitação das espécies, para que se possa conhecer e entender a real diversidade dos grupos de microalgas, requer a utilização de vários conceitos de espécies, em uma abordagem integrativa. Um desses conceitos, que tem sido proposto para auxiliar na delimitação específica (MALAVASI *et al.*, 2016; ŠKALOUD; RINDI, 2013) e entender a diversidade funcional dos grupos é o Conceito Ecológico

de Espécie, em que organismos são considerados de uma mesma espécie quando apresentam um mesmo nicho ecológico (DE QUEIROZ, 2007). A ideia de nicho ecológico compreende as tolerâncias e as necessidades de um organismo (BEGON; COLIN; HARPER, 2007), ou seja, relaciona-se com o modo de vida do organismo e consequentemente da espécie. Essa ideia, portanto, abrange a maneira como uma espécie se relaciona com os recursos e as condições ambientais, incluindo assim as interações que estabelece com outros organismos.

Nesse contexto a existência de relações específicas sugere que grupos taxonomicamente próximos apresentam respostas metabólicas semelhantes quando interagindo com os mesmos grupos de organismos, como as bactérias, por exemplo . Essas repostas podem refletir na sua capacidade reprodutiva e na função que desempenham no ambiente. Por exemplo, mudanças no perfil bioquímico ou no biovolume do fitoplâncton podem significar mais ou menos suscetibilidade à predação. Assim o melhor entendimento de como a presença de bactérias pode influenciar as células das microalgas poderá ser de grande valia tanto para a aplicação da taxonomia integrativa, quanto para a delimitação de espécies através do conceito ecológico, uma vez que se espera que sob efeito do mesmo grupo de bactérias, cepas de microalgas da mesma espécie apresentem repostas morfológicas e bioquímicas mais próximas do que aquelas encontradas para cepas de diferentes espécies.

1.6. Referências

- ABD EL-HACK, M. E.; ABDELNOUR, S.; ALAGAWANY, M.; ABDO, M.; SAKR, M. A.; KHAFAGA, A. F.; MAHGOUB, S. A.; ELNESR, S. S.; GEBRIEL, M. G. Microalgae in modern cancer therapy: Current knowledge. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 111, p. 42–50, 2019.
- ADETUNJI, C. O.; AKRAM, M.; ADETUYI, B. O.; SAID, F.; RIAZ, T.; OLANIYAN, O. T.; ABEL, I.; OZOLUA, P. O.; BODUNRINDE, R. E.; WIKE, N. Y. Application of Biofuels for Bioenergy: Recent Advances. **Next-Generation Algae: Volume I: Applications in Agriculture, Food and Environment**, p. 331–360, 2023.
- ALAM, M. A.; XU, J.-L.; WANG, Z. **Microalgae biotechnology for food, health and high value products**. [s.l.] Springer, 2020.
- ALATEYAH, N.; AHMAD, S.; GUPTA, I.; FOUZAT, A.; THAHER, M. I.; DAS, P.; AL MOUSTAFA, A.-E.; OUHTIT, A. *Haematococcus pluvialis* microalgae extract inhibits proliferation, invasion, and induces apoptosis in breast cancer cells. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, p. 882956, 2022.
- ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, A.; UGGETTI, E.; SERRANO, L.; GORCHS, G.; FERRER, I.; DÍEZ-MONTERO, R. Can microalgae grown in wastewater reduce the use of inorganic fertilizers? **Journal of environmental management**, v. 323, p. 116224, 2022.
- ANDERSEN, R. A. **Algal culturing techniques**. [s.l.] Elsevier, 2005.
- ANDO, H.; FUNASAKA, Y.; OKA, M.; OHASHI, A.; FURUMURA, M.; MATSUNAGA, J.; MATSUNAGA, N.; HEARING, V. J.; ICHIHASHI, M. Possible involvement of proteolytic degradation of tyrosinase in the regulatory effect of fatty acids on melanogenesis. **Journal of lipid research**, v. 40, n. 7, p. 1312–1316, 1999.
- ANDO, H.; RYU, A.; HASHIMOTO, A.; OKA, M.; ICHIHASHI, M. Linoleic acid and α -linolenic acid lightens ultraviolet-induced hyperpigmentation of the skin. **Archives of dermatological research**, v. 290, p. 375–381, 1998.
- ATHBI, A. M.; AL-MAYAH, S. H.; KHALAF, A. K. Antiparasitic activity of the microalgae *Cladophora crispata* against the Protoscolices of hydatid cysts compared with albendazole drug. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 30, 2014.

- AYELE, A.; GETACHEW, D.; KAMARAJ, M.; SURESH, A. Phycoremediation of synthetic dyes: an effective and eco-friendly algal technology for the dye abatement. **Journal of Chemistry**, v. 2021, p. 1–14, 2021.
- AZEVEDO, J. L. de; PAMPHILE, J. A.; QUECINE-VERDI, M. C.; LACAVA, P. T.; COSTA, S. O. P. da P. P.-M. **Biotecnologia Microbiana Ambiental** Eduem, 2018.
- BAGATINI, I. L.; EILER, A.; BERTILSSON, S.; KLAVERNESS, D.; TESSAROLLI, L. P.; VIEIRA, A. A. H. Host-specificity and dynamics in bacterial communities associated with bloom-forming freshwater phytoplankton. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85950, 2014.
- BAGATINI, I. L.; MECCHERI, F. S.; PAULSEN, B. S.; GARCIA DA SILVA, T.; BARSETT, H.; HENRIQUES VIEIRA, A. A. Diversity of monosaccharides and glycosidic linkages on extracellular polysaccharides of the microalga *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae). **Phycologia**, v. 62, n. 1, p. 36–47, 2023.
- BALDAUF, S.; ROMERALO, M.; CARR, M. The evolutionary origin of animals and fungi. **Evolution from the Galapagos: Two Centuries after Darwin**, p. 73–106, 2013.
- BARBANO, D.; DIAZ, R.; ZHANG, L.; SANDRIN, T.; GERKEN, H.; DEMPSTER, T. Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- BARKIA, I.; SAARI, N.; MANNING, S. R. Microalgae for high-value products towards human health and nutrition. **Marine drugs**, v. 17, n. 5, p. 304, 2019.
- BASHEER, S.; HUO, S.; ZHU, F.; QIAN, J.; XU, L.; CUI, F.; ZOU, B. Microalgae in human health and medicine. **Microalgae biotechnology for food, health and high value products**, p. 149–174, 2020.
- BEGON, M.; COLIN, R. T.; HARPER, J. L. **Ecology – From Individuals to Ecosystems**, 4th ed., Michael Begon, Colin R. Townsend, John L. Harper, Blackwell Publishing, Oxford, 2005, 738 pages, Price £37.50 (paperback) ISBN: 1405111178. [s.l: s.n.]v. 135309–309 p.
- BELL, W.; MITCHELL, R. Chemotactic and growth responses of marine bacteria to

- algal extracellular products. **The Biological Bulletin**, v. 143, n. 2, p. 265–277, 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/1540052>>.
- BENEMANN, J. R.; TILLET, D. M.; WEISSMAN, J. C. Microalgae biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 5, n. 2, p. 47–53, 1987.
- BOMBELLI, P.; SAVANTH, A.; SCARAMPI, A.; ROWDEN, S. J. L.; GREEN, D. H.; ERBE, A.; ÅRSTØL, E.; JEVREMOVIC, I.; HOHMANN-MARRIOTT, M. F.; TRASATTI, S. P. Powering a microprocessor by photosynthesis. **Energy & Environmental Science**, v. 15, n. 6, p. 2529–2536, 2022.
- BOROWITZKA, M. A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. **Journal of biotechnology**, v. 70, n. 1–3, p. 313–321, 1999.
- BOROWITZKA, M. A. Chemically-Mediated Interactions in Microalgae. *In*: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 321–357.
- BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. **The Physiology of Microalgae**. [s.l.] Springer International Publishing, 2016.
- BRATCHKOVA, A.; KROUMOV, A. D. Microalgae as producers of biologically active compounds with antibacterial, antiviral, antifungal, antialgal, antiprotozoal, antiparasitic and anticancer activity. **Acta Microbiol Bulg**, v. 36, n. 3, p. 79–89, 2020.
- BRODIE, J. Systematics of the species-rich algae: red algal classification, phylogeny and speciation. **Reconstructing the tree of life: taxonomy and systematics of species rich taxa**, p. 323–336, 2007.
- BRODIE, J.; LEWIS, J. **Unravelling the algae: The past, present, and future of algal systematic**. 1st. ed. [s.l.: s.n.]402 p.
- BRUCKNER, C. G.; REHM, C.; GROSSART, H.; KROTH, P. G. Growth and release of extracellular organic compounds by benthic diatoms depend on interactions with bacteria. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 4, p. 1052–1063, 2011.
- BUX, F. **Biotechnological applications of microalgae: biodiesel and value-added products**. [s.l.] CRC Press, 2013.
- BUX, F.; CHISTI, Y. **Algae Biotechnology: Products and Processes**. [s.l.] Springer,

2016.

- CAMACHO, F.; MACEDO, A.; MALCATA, F. Potential industrial applications and commercialization of microalgae in the functional food and feed industries: A short review. **Marine drugs**, v. 17, n. 6, p. 312, 2019.
- CARBONE, D. A.; PELLONE, P.; LUBRITTO, C.; CINIGLIA, C. Evaluation of microalgae antiviral activity and their bioactive compounds. **Antibiotics**, v. 10, n. 6, p. 746, 2021.
- CARUANA, A. M. N.; AMZIL, Z. Microalgae and toxins. *In*: **Microalgae in health and disease prevention**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 263–305.
- CAVALIER-SMITH, T. Evolution and relationships of algae: major branches of the tree of life. *In*: **Unravelling the algae: The past, present, and future of algal systematic**. [s.l.: s.n.]p. 21–56.
- CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 250–276, 2016.
- CHAPMAN, R. L. Algae: the world's most important “plants”—an introduction. **Mitigation and Adaptation Strategies for Global Change**, v. 18, n. 1, p. 5–12, 2013.
- CHEONG, S. H.; KIM, M. Y.; SOK, D.-E.; HWANG, S.-Y.; KIM, J. H.; KIM, H. R.; LEE, J. H.; KIM, Y.-B.; KIM, M. R. *Spirulina* prevents atherosclerosis by reducing hypercholesterolemia in rabbits fed a high-cholesterol diet. **Journal of nutritional science and vitaminology**, v. 56, n. 1, p. 34–40, 2010.
- CHISTI, Y. Society and microalgae: Understanding the past and present. *In*: **Microalgae in health and disease prevention**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 11–21.
- CIRRI, E.; POHNERT, G. Algae–bacteria interactions that balance the planktonic microbiome. **New Phytologist**, v. 223, n. 1, p. 100–106, 2019.
- CONG, P.; CHEN, S.; CHEN, H. Effects of diatomite on the properties of asphalt binder. **Construction and Building Materials**, v. 30, p. 495–499, 2012.
- COSKUN, Z. K.; KEREM, M.; GURBUZ, N.; OMEROGLU, S.; PASAOGLU, H.; DEMIRTAS, C.; LORTLAR, N.; SALMAN, B.; PASAOGLU, O. T.; TURGUT, H. B. The study of biochemical and histopathological effects of *spirulina* in rats with

- TNBS-induced colitis. **Bratislavske lekarske listy**, v. 112, n. 5, p. 235–243, 2011.
- DANGER, M.; OUMAROU, C.; BENEST, D.; LACROIX, G. Bacteria can control stoichiometry and nutrient limitation of phytoplankton. **Functional Ecology**, p. 202–210, 2007.
- DE CANO, M. M. S.; DE MULE, M. C.; DE CAIRE, G. Z.; DE HALPERIN, D. R. Inhibition of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* by phenolic compounds from the terrestrial cyanobacterium *Nostoc muscorum*. **Journal of Applied Phycology**, v. 2, p. 79–81, 1990.
- DE HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2007.
- DE MORAIS, M. G.; VAZ, B. da S.; DE MORAIS, E. G.; COSTA, J. A. V. Biologically active metabolites synthesized by microalgae. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.
- DE SIQUEIRA CASTRO, J.; CALIJURI, M. L.; FERREIRA, J.; ASSEMAN, P. P.; RIBEIRO, V. J. Microalgae based biofertilizer: A life cycle approach. **Science of The Total Environment**, v. 724, p. 138138, 2020a.
- DE SIQUEIRA CASTRO, J.; CALIJURI, M. L.; MATTIELLO, E. M.; RIBEIRO, V. J.; ASSEMAN, P. P. Algal biomass from wastewater: soil phosphorus bioavailability and plants productivity. **Science of The Total Environment**, v. 711, p. 135088, 2020b.
- DEEPA, K. P.; THAJUDDIN, N. Biofilm inhibitory potential of *Oscillatoria tenuis* against *Candida albicans*. **Plant Science Today**, v. 10, n. 3, p. 422–429, 2023.
- DELWICHE, C. F. Algae in the warp and weave of life: Bound by plastids. In: **Unraveling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics**. [s.l.: s.n.]p. 7–20.
- DEVI, N. D.; SUN, X.; HU, B.; GOUD, V. V. Bioremediation of domestic wastewater with microalgae-cyanobacteria co-culture by nutritional balance approach and its

- feasibility for biodiesel and animal feed production. **Chemical Engineering Journal**, v. 454, p. 140197, 2023.
- DINESHBABU, G.; GOSWAMI, G.; KUMAR, R.; SINHA, A.; DAS, D. Microalgae–nutritious, sustainable aqua-and animal feed source. **Journal of Functional Foods**, v. 62, p. 103545, 2019.
- DINESHKUMAR, R.; KUMARAVEL, R.; GOPALSAMY, J.; SIKDER, M. N. A.; SAMPATHKUMAR, P. Microalgae as bio-fertilizers for rice growth and seed yield productivity. **Waste and biomass valorization**, v. 9, p. 793–800, 2018.
- DORLING, M.; MCAULEY, P. J.; HODGE, H. Effect of pH on growth and carbon metabolism of maltose-releasing *Chlorella* (Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 32, n. 1, p. 19–24, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/09541449710001719335>>.
- DZIALLAS, C.; GROSSART, H. Temperature and biotic factors influence bacterial communities associated with the cyanobacterium *Microcystis* sp. **Environmental microbiology**, v. 13, n. 6, p. 1632–1641, 2011.
- EBRAHIMI-MAMEGHANI, M.; SADEGHI, Z.; FARHANGI, M. A.; VAGHEF-MEHRABANY, E.; ALIASHRAFI, S. Glucose homeostasis, insulin resistance and inflammatory biomarkers in patients with non-alcoholic fatty liver disease: Beneficial effects of supplementation with microalgae *Chlorella vulgaris*: A double-blind placebo-controlled randomized clinical trial. **Clinical nutrition**, v. 36, n. 4, p. 1001–1006, 2017.
- EMAMI, K.; HACK, E.; NELSON, A.; BRAIN, C. M.; LYNE, F. M.; MESBAHI, E.; DAY, J. G.; CALDWELL, G. S. Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- ERIKSEN, N. T. Production of phycocyanin---a pigment with applications in biology, biotechnology, foods and medicine. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 80, n. 1, p. 1–14, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00253-008-1542-y>>.
- FABRIS, M.; ABBRIANO, R. M.; PERNICE, M.; SUTHERLAND, D. L.; COMMAULT, A. S.; HALL, C. C.; LABEEUW, L.; MCCAULEY, J. I.; KUZHIUPARAMBIL, U.;

- RAY, P. Emerging technologies in algal biotechnology: toward the establishment of a sustainable, algae-based bioeconomy. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 279, 2020.
- FAYYAD, R. J.; LEFTA, S. N.; MOHAMMED, D. Y.; MALIKI, S. A. J. Study the Efficiency of Two Concentrations from Algae *Cladophora glomerata* Extract on the *Giardia lamblia* parasite. **Baghdad Science Journal**, v. 19, n. 2, p. 271, 2022.
- FISHER, B. L.; SMITH, M. A. A revision of Malagasy species of *Anochetus mayr* and *Odontomachus latreille* (Hymenoptera: Formicidae). **PLoS one**, v. 3, n. 5, p. e1787, 2008.
- FRIEND, A. D.; GEIDER, R. J.; BEHRENFELD, M. J.; STILL, C. J. Photosynthesis in global-scale models. **Photosynthesis in silico: understanding complexity from molecules to ecosystems**, p. 465–497, 2009.
- FURTADO, I. F. S. P. C.; VASCONCELOS, M. W.; STAHLSCHMIDT, R. M.; SYDNEY, A. C. N.; DE CASTILHOS GHISI, N.; SYDNEY, E. B. Scientometric analysis of microalgae wastewater treatment. **Valorization of Microalgal Biomass and Wastewater Treatment**, p. 1–20, 2023.
- GALLEGO, R.; VALDÉS, A.; SUÁREZ-MONTENEGRO, Z. J.; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J. D.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; HERRERO, M. Anti-inflammatory and neuroprotective evaluation of diverse microalgae extracts enriched in carotenoids. **Algal Research**, v. 67, p. 102830, 2022.
- GANTENBEIN, U. L. Poison and its dose: paracelsus on toxicology. *In: Toxicology in the Middle Ages and Renaissance*. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 1–10.
- GARCIA DA SILVA, T.; BOCK, C.; SANT'ANNA, L. C.; BAGATINI, L. I.; WODNIOK, S.; VIEIRA, H. A. A. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017. Disponível em: <<https://fottea.czechphycology.cz/artkey/fot-201701-0001.php>>.
- GARSDALE, M. **Production of plastics worldwide from 1950 to 2019**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://www.statista.com/statistics/282732/global-production-of-plastics-since-1950/>>.

- GOSWAMI, R. K.; AGRAWAL, K.; VERMA, P. Phycoremediation of nitrogen and phosphate from wastewater using *Picochlorum* sp.: A tenable approach. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 3–4, p. 279–295, 2022.
- GOUVÊA, S. P.; VIEIRA, A. A. H.; LOMBARDI, A. T. Copper and cadmium complexation by high molecular weight materials of dominant microalgae and of water from a eutrophic reservoir. **Chemosphere**, v. 60, n. 9, p. 1332–1339, 2005.
- GRAHAM, L. E.; GRAHAM, J. M.; COOK, M. E.; WILCOX, L. W. T. A.-T. T.-. **Algae**[Madison]. LJLM Press [Madison], 2016.
- GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2006.
- GROSSHAGAUER, S.; KRAEMER, K.; SOMOZA, V. The true value of *Spirulina*. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 68, n. 14, p. 4109–4115, 2020.
- GUIRY, M. D. How many species of algae are there? **Journal of phycology**, v. 48, n. 5, p. 1057–1063, 2012.
- GUIRY, M. D.; GUIRY, G. M. AlgaeBase. **AlgaeBase**, 2023.
- GULERI, S.; TIWARI, A. Algae and ageing. *In*: **Microalgae biotechnology for food, health and high value products**. [s.l.] Springer, 2020. p. 267–293.
- HACHICHA, R.; ELLEUCH, F.; BEN HLIMA, H.; DUBESSAY, P.; DE BAYNAST, H.; DELATTRE, C.; PIERRE, G.; HACHICHA, R.; ABDELKAFI, S.; MICHAUD, P. Biomolecules from microalgae and cyanobacteria: Applications and market survey. **Applied Sciences**, v. 12, n. 4, p. 1924, 2022.
- HASSAN, S.; MEENATCHI, R.; PACHILLU, K.; BANSAL, S.; BRINDANGNANAM, P.; AROCKIARAJ, J.; KIRAN, G. S.; SELVIN, J. Identification and characterization of the novel bioactive compounds from microalgae and cyanobacteria for pharmaceutical and nutraceutical applications. **Journal of Basic Microbiology**, v. 62, n. 9, p. 999–1029, 2022.
- HERRMANN, M.; JOPPE, H.; PERTILE, P.; ZANELLA, L. **Extracts of *Isochrysis* sp.** US20200222730A1. 2019.
- HERRMANN, M.; ZANELLA, L.; PERTILE, P.; GAEBLER, S.; JOPPE, H.; KNUPFER, M.; MEYER, I.; VIELHABER, G. A novel biological skin tanner from microalgae.

In: 27th IFSCC Congress, Johannesburg, South Africa, 2012a, [...]. 2012. p. 330–331.

HERRMANN, M.; ZANELLA, L.; PERTILE, P.; GAEBLER, S.; JOPPE, H.; VIELHABER, G.; SCHMAUS, G. Microalgae derived extract with promising anti-hair loss potential. In: 27th IFSCC Congress, Johannesburg, South Africa, 2012b, [...]. 2012. p. 364–366.

HOSEINI, S. M.; KHOSRAVI-DARANI, K.; MOZAFARI, M. R. Nutritional and medical applications of spirulina microalgae. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1231–1237, 2013.

HUSSAIN, F.; SHAH, S. Z.; AHMAD, H.; ABUBSHAIT, S. A.; ABUBSHAIT, H. A.; LAREF, A.; MANIKANDAN, A.; KUSUMA, H. S.; IQBAL, M. Microalgae an ecofriendly and sustainable wastewater treatment option: Biomass application in biofuel and bio-fertilizer production. A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 137, p. 110603, 2021.

IBRAHIM, T. N. B. T.; FEISAL, N. A. S.; KAMALUDIN, N. H.; CHEAH, W. Y.; HOW, V.; BHATNAGAR, A.; MA, Z.; SHOW, P. L. Biological active metabolites from microalgae for healthcare and pharmaceutical industries: a comprehensive review. **Bioresource Technology**, p. 128661, 2023.

ISLAM, M. N.; ALSENANI, F.; SCHENK, P. M. Microalgae as a sustainable source of nutraceuticals. **Microbial functional foods and nutraceuticals**, p. 1–19, 2017.

JASSEY, V. E. J.; WALCKER, R.; KARDOL, P.; GEISEN, S.; HEGER, T.; LAMENTOWICZ, M.; HAMARD, S.; LARA, E. Contribution of soil algae to the global carbon cycle. **New Phytologist**, v. 234, n. 1, p. 64–76, 2022.

JENSEN, G. S. Blue-green algae as an immuno-enhancer and biomodulator. **J. Am. Nutraceutical Assoc.**, v. 3, p. 24–30, 2001.

JIMENEZ-BAMBAGUE, E. M.; ORTIZ-ESCOBAR, A. C.; MADERA-PARRA, C. A.; MACHUCA-MARTINEZ, F. Microalgae for removing pharmaceutical compounds from wastewater. In: **Advanced Materials and Technologies for Wastewater Treatment**. [s.l.] CRC Press, 2021. p. 247–284.

JUNG, M.-H.; LEE, S.-S.; KIM, H.-A.; HWANG, H.-J. Comparative study on the effects of six species of microalgae extracts on hair loss prevention and scalp

- improvement. **Journal of Life Science**, v. 28, n. 3, p. 345–350, 2018.
- KAMBLE, P.; CHERIYAMUNDATH, S.; LOPUS, M.; SIRISHA, V. L. Chemical characteristics, antioxidant and anticancer potential of sulfated polysaccharides from *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal of Applied Phycology**, v. 30, p. 1641–1653, 2018.
- KARTIK, A.; AKHIL, D.; LAKSHMI, D.; GOPINATH, K. P.; ARUN, J.; SIVARAMAKRISHNAN, R.; PUGAZHENDHI, A. A critical review on production of biopolymers from algae biomass and their applications. **Bioresource Technology**, v. 329, p. 124868, 2021.
- KAWAHIGASHI, H. Transgenic plants for phytoremediation of herbicides. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, n. 2, p. 225–230, 2009.
- KESHRI, J. P. Algae in medicine. **Medicinal Plants: Various Perspectives**, p. 31–50, 2012.
- KHOZIN-GOLDBERG, I.; ISKANDAROV, U.; COHEN, Z. LC-PUFA from photosynthetic microalgae: occurrence, biosynthesis, and prospects in biotechnology. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 91, p. 905–915, 2011.
- KIRAN, B. R.; VENKATA MOHAN, S. Microalgal cell biofactory—therapeutic, nutraceutical and functional food applications. **Plants**, v. 10, n. 5, p. 836, 2021.
- KOUL, B.; SHARMA, K.; SHAH, M. P. Phycoremediation: A sustainable alternative in wastewater treatment (WWT) regime. **Environmental Technology & Innovation**, v. 25, p. 102040, 2022.
- KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 125–129, 2015.
- KOYANDE, A. K.; CHEW, K. W.; RAMBABU, K.; TAO, Y.; CHU, D.-T.; SHOW, P.-L. Microalgae: A potential alternative to health supplementation for humans. **Food Science and Human Wellness**, v. 8, n. 1, p. 16–24, 2019.
- KRIENITZ, L.; BOCK, C.; DADHEECH, P. K.; KOTUT, K.; LUO, W.; SCHAGERL, M. An Underexplored Resource for Biotechnology: Selected Microphytes of East African Soda Lakes and Adjacent Waters. *In*: SCHAGERL, M. **Soda Lakes of**

East Africa. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 323–343.

KRIENITZ, L.; BOCK, C.; NOZAKI, H.; WOLF, M. SSU rRNA GENE PHYLOGENY OF MORPHOSPECIES AFFILIATED TO THE BIOASSAY ALGA “*SELENASTRUM CAPRICORNUTUM*” RECOVERED THE POLYPHYLETIC ORIGIN OF CRESCENT-SHAPED CHLOROPHYTA 1. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 4, p. 880–893, 2011.

KRIENITZ, L.; USTINOVA, I.; FRIEDL, T.; HUSS, V. A. R. Traditional generic concepts versus 18S rRNA gene phylogeny in the green algal family Selenastraceae (Chlorophyceae, Chlorophyta). **Journal of Phycology**, v. 37, n. 5, p. 852–865, 2001.

KRISHNAMOORTHY, S.; MANICKAM, P. Phycoremediation of industrial wastewater: challenges and prospects. **Bioremediation for Environmental Sustainability**, p. 99–123, 2021.

KU, C. S.; YANG, Y.; PARK, Y.; LEE, J. Health benefits of blue-green algae: prevention of cardiovascular disease and nonalcoholic fatty liver disease. **Journal of Medicinal Food**, v. 16, n. 2, p. 103–111, 2013.

KWON, K.-C.; LAMB, A.; FOX, D.; JEGATHESE, S. J. P. An evaluation of microalgae as a recombinant protein oral delivery platform for fish using green fluorescent protein (GFP). **Fish & shellfish immunology**, v. 87, p. 414–420, 2019.

LAGANÀ, P.; CARUSO, G.; BARONE, C.; CARUSO, G.; PARISI, S.; MELCARNE, L.; MAZZÙ, F.; DELIA, A. S. **Microbial toxins and related contamination in the food industry**. [s.l.] Springer, 2015.

LAGE, V. M. G. B.; DEEGAN, K. R.; SANTOS, G. F.; DE JESUS BARBOSA, C.; DA CUNHA LIMA, S. T. Atividade biológica das microalgas em dermatófitos: Revisão. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 11, p. e126111133404–e126111133404, 2022.

LEE, A.; KIM, J. Y.; HEO, J.; CHO, D.-H.; KIM, H.-S.; AN, I.-S.; AN, S.; BAE, S. The inhibition of melanogenesis via the PKA and ERK signaling pathways by *Chlamydomonas reinhardtii* extract in B16F10 melanoma cells and artificial human skin equivalents. 2018.

LEE, H.-W.; ROH, S. W.; CHO, K.; KIM, K.-N.; CHA, I.-T.; YIM, K. J.; SONG, H. S.;

- NAM, Y.-D.; ODA, T.; CHUNG, Y.-H.; KIM, S. J.; CHOI, J.-S.; KIM, D. Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. **Talanta**, v. 132, p. 630–634, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914014008108>>.
- LETSIOU, S.; KALLIAMPAKOU, K.; GARDIKIS, K.; MANTECON, L.; INFANTE, C.; CHATZIKONSTANTINO, M.; LABROU, N. E.; FLEMETAKIS, E. Skin protective effects of *Nannochloropsis gaditana* extract on H₂O₂-stressed human dermal fibroblasts. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 221, 2017.
- LEUNG, P.; LEE, H.-H.; KUNG, Y.-C.; TSAI, M.-F.; CHOU, T.-C. Therapeutic effect of C-phycocyanin extracted from blue green algae in a rat model of acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.
- LEVINE, I.; FLEURENCE, J. **Microalgae in health and disease prevention**. [s.l.] Academic Press, 2018.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WANG, B.; WU, N.; LAN, C. Q. Effects of nitrogen sources on cell growth and lipid accumulation of green alga *Neochloris oleoabundans*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 81, p. 629–636, 2008a.
- LI, Y.; HORSMAN, M.; WU, N.; LAN, C. Q.; DUBOIS-CALERO, N. Biofuels from microalgae. **Biotechnology progress**, v. 24, n. 4, p. 815–820, 2008b.
- LIU, Y.; REN, X.; FAN, C.; WU, W.; ZHANG, W.; WANG, Y. Health benefits, food applications, and sustainability of microalgae-derived N-3 PUFA. **Foods**, v. 11, n. 13, p. 1883, 2022.
- MA, K.; BAO, Q.; WU, Y.; CHEN, S.; ZHAO, S.; WU, H.; FAN, J. Evaluation of microalgae as immunostimulants and recombinant vaccines for diseases prevention and control in aquaculture. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 8, p. 590431, 2020.
- MA, N. L.; LAM, S. S.; ZAIDAH, R. The application of algae for cosmeceuticals in the Omics Age. **Genomics, proteomics and metabolomics in nutraceuticals and functional foods**, p. 476–488, 2015.
- MACEDO, A. R. S.; SILVA, A. S.; DA LUZ, D. S.; FERREIRA, R. L. S.; LOURENÇO, C. S.; GOMES, U. U. Study of the effect of diatomite on physico-mechanical

properties of concrete. **Cerâmica**, v. 66, p. 50–55, 2019.

- MALAVASI, V.; ŠKALoud, P.; RINDI, F.; TEMPESTA, S.; PAOLETTI, M.; PASQUALETTI, M. DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: a re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151137, 2016.
- MALHOTRA, A.; THORPE, R. S. Maximizing information in systematic revisions: a combined molecular and morphological analysis of a cryptic green pitviper complex (*Trimeresurus stejnegeri*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 82, n. 2, p. 219–235, 2004.
- MANNING, S. R.; NOBLES, D. R. Impact of global warming on water toxicity: cyanotoxins. **Current Opinion in Food Science**, v. 18, p. 14–20, 2017.
- MAO, T. K.; WATER, J. Van de; GERSHWIN, M. E. Effects of a Spirulina-based dietary supplement on cytokine production from allergic rhinitis patients. **Journal of Medicinal Food**, v. 8, n. 1, p. 27–30, 2005.
- MAOKA, T. Carotenoids as natural functional pigments. **Journal of natural medicines**, v. 74, n. 1, p. 1–16, 2020.
- MAPSTONE, L. J.; LEITE, M. N.; PURTON, S.; CRAWFORD, I. A.; DARTNELL, L. Cyanobacteria and microalgae in supporting human habitation on Mars. **Biotechnology Advances**, v. 59, p. 107946, 2022.
- MARREZ, D. A.; NAGUIB, M. M.; SULTAN, Y. Y.; HIGAZY, A. M. Antimicrobial and anticancer activities of *Scenedesmus obliquus* metabolites. **Heliyon**, v. 5, n. 3, 2019.
- MARTÍNEZ ANDRADE, K. A.; LAURITANO, C.; ROMANO, G.; IANORA, A. Marine microalgae with anti-cancer properties. **Marine drugs**, v. 16, n. 5, p. 165, 2018.
- MCCLEMENTS, M. E.; STAURENGHI, F.; MACLAREN, R. E.; CEHAJIC-KAPETANOVIC, J. Optogenetic gene therapy for the degenerate retina: recent advances. **Frontiers in neuroscience**, v. 14, p. 570909, 2020.
- MELLO, R. V.; MECCHERI, F. S.; BAGATINI, I. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIEIRA, A. A. H. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae

- (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, p. 151–160, 2017.
- MENEZES, R. S.; LELES, M. I. G.; SOARES, A. T.; FRANCO, P. I. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Avaliação da potencialidade de microalgas dulcícolas como fonte de matéria-prima graxa para a produção de biodiesel. **Química Nova**, v. 36, p. 10–15, 2013.
- MISHRA, N.; GUPTA, E.; SINGH, P.; PRASAD, R. Application of microalgae metabolites in food and pharmaceutical industry. *In: Preparation of Phytopharmaceuticals for the Management of Disorders*. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 391–408.
- MISHRA, N.; MISHRA, N. Exploring the biologically active metabolites of *Isochrysis galbana* in pharmaceutical interest: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 9, n. 6, p. 2162–2174, 2018.
- MORI, C. C.; BAGATINI, I. L.; DA SILVA, T. G.; PARRISH, C. C.; VIEIRA, A. A. H. Use of fatty acids in the chemotaxonomy of the family Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae). **Phytochemistry**, v. 151, p. 9–16, 2018.
- MORVAN, P.; VALLEE, R. Effects of *Chlorella* extract on skin. **Personal Care**, v. 2007, p. 57–64, 2007.
- MOUSAVIAN, Z.; SAFAVI, M.; AZIZMOHSENI, F.; HADIZADEH, M.; MIRDAMADI, S. Characterization, antioxidant and anticoagulant properties of exopolysaccharide from marine microalgae. **AMB Express**, v. 12, n. 1, p. 27, 2022.
- NAGARAJAN, D.; VARJANI, S.; LEE, D.-J.; CHANG, J.-S. Sustainable aquaculture and animal feed from microalgae—nutritive value and techno-functional components. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 150, p. 111549, 2021.
- NICCOLAI, A.; BIGAGLI, E.; BIONDI, N.; RODOLFI, L.; CINCI, L.; LUCERI, C.; TREDICI, M. R. In vitro toxicity of microalgal and cyanobacterial strains of interest as food source. **Journal of Applied Phycology**, v. 29, p. 199–209, 2017.
- NICCOLAI, A.; ZITTELLI, G. C.; RODOLFI, L.; BIONDI, N.; TREDICI, M. R. Microalgae of interest as food source: Biochemical composition and digestibility. **Algal Research**, v. 42, p. 101617, 2019.

- NORDHAUS, W. Climate change: The ultimate challenge for economics. **American Economic Review**, v. 109, n. 6, p. 1991–2014, 2019.
- NWOBA, E. G.; OGBONNA, C. N.; ISHIKA, T.; VADIVELOO, A. Microalgal pigments: a source of natural food colors. **Microalgae biotechnology for food, health and high value products**, p. 81–123, 2020.
- OHTA, S.; ONO, F.; SHIOMI, Y.; NAKAO, T.; AOZASA, O.; NAGATE, T.; KITAMURA, K.; YAMAGUCHI, S.; NISHI, M.; MIYATA, H. Anti-herpes simplex virus substances produced by the marine green alga, *Dunaliella primolecta*. **Journal of applied phycology**, v. 10, p. 349–356, 1998.
- OLASEHINDE, T. A.; OLANIRAN, A. O.; OKOH, A. I. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 22, n. 3, p. 480, 2017.
- OLIVEIRA, M. C. de. **Origem e evolução das algas eucarióticas e de seus cloroplastos com ênfase nas algas vermelhas (Rhodophyta)** Universidade de São Paulo, 2005.
- ØSTENSVIK; SKULBERG; UNDERDAL; HORMAZABAL. Antibacterial properties of extracts from selected planktonic freshwater cyanobacteria—a comparative study of bacterial bioassays. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 6, p. 1117–1124, 1998.
- PALIWAL, C.; GHOSH, T.; GEORGE, B.; PANCHAL, I.; MAURYA, R.; CHOKSHI, K.; GHOSH, A.; MISHRA, S. Microalgal carotenoids: Potential nutraceutical compounds with chemotaxonomic importance. **Algal Research**, v. 15, p. 24–31, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926416300285>>.
- PARK, Y.-K.; LEE, J. Achievements in the production of bioplastics from microalgae. **Phytochemistry Reviews**, p. 1–19, 2022.
- PAUL, C.; MAUSZ, M. A.; POHNERT, G. A co-culturing/metabolomics approach to investigate chemically mediated interactions of planktonic organisms reveals influence of bacteria on diatom metabolism. **Metabolomics**, v. 9, n. 2, p. 349–359, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11306-012-0453-1>>.
- PENG, L.; FU, D.; CHU, H.; WANG, Z.; QI, H. Biofuel production from microalgae: a

- review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, p. 285–297, 2020.
- PEREIRA, L. **Therapeutic and nutritional uses of algae**. [s.l.] CRC Press, 2018.
- PERTILE, P.; ZANELLA, L.; HERRMANN, M.; JOPPE, H.; GAEBLER, S. **Extracts of *Tetraselmis* sp.** Google Patents, 20 set. 2016.
- PHANG, S.-M.; CHU, W.-L.; RABIEI, R. Phycoremediation. **The algae world**, p. 357–389, 2015.
- PHILLIPSON, J. **Ecological energetics**. [s.l.] Edward Arnold London, 1966. .
- PRADHAN, B.; BHUYAN, P. P.; NAYAK, R.; PATRA, S.; BEHERA, C.; KI, J.-S.; RAGUSA, A.; LUKATKIN, A. S.; JENA, M. Microalgal phycoremediation: A glimpse into a sustainable environment. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 525, 2022.
- PRATT, R.; DANIELS, T. C.; EILER, J. J.; GUNNISON, J. B.; KUMLER, W. D.; ONETO, J. F.; STRAIT, L. A.; SPOEHR, H. A.; HARDIN, G. J.; MILNER, H. W. Chlorellin, an antibacterial substance from *Chlorella*. **Science**, v. 99, n. 2574, p. 351–352, 1944.
- PRIYADARSHANI, I.; RATH, B. Commercial and industrial applications of micro algae—A review. **J algal biomass utln**, v. 3, n. 4, p. 89–100, 2012.
- PRIYADHARSHINI, S. D.; BABU, P. S.; MANIKANDAN, S.; SUBBAIYA, R.; GOVARTHANAN, M.; KARMEGAM, N. Phycoremediation of wastewater for pollutant removal: A green approach to environmental protection and long-term remediation. **Environmental Pollution**, v. 290, p. 117989, 2021.
- RAHMAN, A.; MILLER, C. D. Microalgae as a source of bioplastics. *In*: **Algal green chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 121–138.
- RAMANAN, R.; KANG, Z.; KIM, B.-H.; CHO, D.-H.; JIN, L.; OH, H.-M.; KIM, H.-S. Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. **Algal Research**, v. 8, p. 140–144, 2015.
- RAMANAN, R.; KIM, B.-H.; CHO, D.-H.; OH, H.-M.; KIM, H.-S. Algae–bacteria interactions: Evolution, ecology and emerging applications. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 1, p. 14–29, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975015300586>>.

- RASOOL, M.; SABINA, E. P.; LAVANYA, B. Anti-inflammatory effect of *Spirulina fusiformis* on adjuvant-induced arthritis in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 12, p. 2483–2487, 2006.
- REYNOLDS, C. S. **The ecology of phytoplankton**. [s.l.] Cambridge University Press, 2006.
- RICCIO, G.; LAURITANO, C. Microalgae with immunomodulatory activities. **Marine drugs**, v. 18, n. 1, p. 2, 2019.
- RODRÍGUEZ-MEIZOSO, I.; JAIME, L.; SANTOYO, S.; SEÑORÁNS, F. J.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Subcritical water extraction and characterization of bioactive compounds from *Haematococcus pluvialis* microalga. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 51, n. 2, p. 456–463, 2010.
- ROMAY, C. H.; GONZALEZ, R.; LEDON, N.; REMIREZ, D.; RIMBAU, V. C-phycocyanin: a biliprotein with antioxidant, anti-inflammatory and neuroprotective effects. **Current protein and peptide science**, v. 4, n. 3, p. 207–216, 2003.
- SAHEL, J.-A.; BOULANGER-SCÉMAMA, E.; PAGOT, C.; ARLEO, A.; GALLUPPI, F.; MARTEL, J. N.; ESPOSTI, S. D.; DELAUX, A.; DE SAINT AUBERT, J.-B.; DE MONTLEAU, C. Partial recovery of visual function in a blind patient after optogenetic therapy. **Nature medicine**, v. 27, n. 7, p. 1223–1229, 2021.
- SANCHES, S. M.; DO PRADO, E. L.; FERREIRA, I. M.; BRAGA, H. F.; VIEIRA, E. M. Presença da toxina microcistina em água, impactos na saúde pública e medidas de controle. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 2, 2012.
- SATHASIVAM, R.; RADHAKRISHNAN, R.; HASHEM, A.; ABD_ALLAH, E. F. Microalgae metabolites: A rich source for food and medicine. **Saudi journal of biological sciences**, v. 26, n. 4, p. 709–722, 2019.
- SATHYA, A. B.; THIRUNAVUKKARASU, A.; NITHYA, R.; NANDAN, A.; SAKTHISHOBANA, K.; KOLA, A. K.; SIVASHANKAR, R.; TUAN, H. A.; DEEPANRAJ, B. Microalgal biofuel production: Potential challenges and prospective research. **Fuel**, v. 332, p. 126199, 2023.
- SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; MODER, K.; SEIFERT, B.; SANETRA, M.; DYRESON, E.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E. A multidisciplinary approach

- reveals cryptic diversity in Western Palearctic *Tetramorium* ants (Hymenoptera: Formicidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 40, n. 1, p. 259–273, 2006.
- SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.; CHRISTIAN, E.; CROZIER, R. H. Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 421–438, 2010.
- SELMİ, C.; LEUNG, P. S. C.; FISCHER, L.; GERMAN, B.; YANG, C.-Y.; KENNY, T. P.; CYSEWSKI, G. R.; GERSHWIN, M. E. The effects of *Spirulina* on anemia and immune function in senior citizens. **Cellular & molecular immunology**, v. 8, n. 3, p. 248–254, 2011.
- SEYMOUR, J. R.; AMIN, S. A.; RAINA, J. B.; STOCKER, R. **Zooming in on the phycosphere: The ecological interface for phytoplankton-bacteria relationships** *Nature Microbiology* 2017.
- SHISHIDO, T. K.; HUMISTO, A.; JOKELA, J.; LIU, L.; WAHLSTEN, M.; TAMRAKAR, A.; FEWER, D. P.; PERMI, P.; ANDREOTE, A. P. D.; FIORE, M. F. Antifungal compounds from cyanobacteria. **Marine drugs**, v. 13, n. 4, p. 2124–2140, 2015.
- SIES, H.; STAHL, W. Carotenoids and UV protection. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 3, p. 749–752, 2004.
- SIMMONS, T. L.; ENGINE, N.; UREÑA, L. D.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; GERWICK, L.; GERWICK, W. H. Viridamides A and B, lipodepsipeptides with antiprotozoal activity from the marine cyanobacterium *Oscillatoria nigro-viridis*. **Journal of natural products**, v. 71, n. 9, p. 1544–1550, 2008.
- SINGH, T.; SINGH, D. K. Phytoremediation of organochlorine pesticides: Concept, method, and recent developments. **International journal of phytoremediation**, v. 19, n. 9, p. 834–843, 2017.
- SINGH, V.; TIWARI, A.; DAS, M. Phyco-remediation of industrial waste-water and flue gases with algal-diesel engenderment from micro-algae: a review. **Fuel**, v. 173, p. 90–97, 2016.
- SIRIPORNADULSIL, S.; DABROWSKI, K.; SAYRE, R. Microalgal vaccines. **Transgenic microalgae as green cell factories**, p. 122–128, 2007.

- SIUZDAK, G. **Mass spectrometry for biotechnology**. [s.l.] Academic press, 1996.
- ŠKALOUD, P.; RINDI, F. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium* (Streptophyta). **Journal of eukaryotic microbiology**, v. 60, n. 4, p. 350–362, 2013.
- SKULBERG, O. M. Microalgae as a source of bioactive molecules—experience from cyanophyte research. **Journal of Applied Phycology**, v. 12, p. 341–348, 2000.
- SOARES, A. T.; MARQUES JÚNIOR, J. G.; LOPES, R. G.; DERNER, R. B.; ANTONIOSI FILHO, N. R. Improvement of the extraction process for high commercial value pigments from *Desmodesmus* sp. microalgae. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 1083–1093, 2016.
- SPOLAORE, P.; JOANNIS-CASSAN, C.; DURAN, E.; ISAMBERT, A. Commercial applications of microalgae. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 101, n. 2, p. 87–96, 2006.
- STAHL, W.; HEINRICH, U.; JUNGSMANN, H.; SIES, H.; TRONNIER, H. Carotenoids and carotenoids plus vitamin E protect against ultraviolet light–induced erythema in humans. **The American journal of clinical nutrition**, v. 71, n. 3, p. 795–798, 2000.
- STAHL, W.; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, n. 6, p. 345–351, 2003.
- STAHL, W.; SIES, H. β -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. **The American journal of clinical nutrition**, v. 96, n. 5, p. 1179S–1184S, 2012.
- TAKEDA, H. **Sugar Composition of the Cell Wall and the Taxonomy of Chlorella (Chlorophyceae)** **Journal of Phycology** 1991. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.1991.00224.x>>.
- TORRES, F. A. E.; PASSALACQUA, T. G.; VELÁSQUEZ, A.; SOUZA, R. A. de; COLEPICOLO, P.; GRAMINHA, M. A. S. New drugs with antiprotozoal activity from marine algae: a review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 265–276, 2014.
- TRIVEDI, J.; AILA, M.; BANGWAL, D. P.; KAUL, S.; GARG, M. O. Algae based

- biorefinery—how to make sense? **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 47, p. 295–307, 2015.
- VAITKEVICIUS-ANTÃO, V.; MOREIRA-SILVA, J.; REINO, I. B. da S. M.; MELO, M. G. N. de; SILVA-JÚNIOR, J. N. da; ANDRADE, A. F. de; ARAÚJO, P. S. R. de; BEZERRA, R. P.; MARQUES, D. de A. V.; FERREIRA, S. Therapeutic Potential of Photosynthetic Microorganisms for Visceral Leishmaniasis: An Immunological Analysis. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 891495, 2022.
- VAN DEN HOEK, C.; MANN, D.; JAHNS, H. M. **Algae: An Introduction to Phycology**. [s.l.] Cambridge University Press, 1996.
- VANDAMME, P.; PEETERS, C. Time to revisit polyphasic taxonomy. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, n. 1, p. 57–65, 2014.
- VANDAMME, P.; POT, B.; GILLIS, M.; DE VOS, P.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological reviews**, v. 60, n. 2, p. 407–438, 1996.
- VEAS, R.; ROJAS-PIRELA, M.; CASTILLO, C.; OLEA-AZAR, C.; MONCADA, M.; ULLOA, P.; ROJAS, V.; KEMMERLING, U. Microalgae extracts: Potential anti-*Trypanosoma cruzi* agents? **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 127, p. 110178, 2020. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S075333222030370X>>.
- VIEIRA, H. H.; BAGATINI, I. L.; GUINART, C. M.; VIEIRA, A. A. H.; VIEIRA, H. H.; BAGATINI, I. L.; GUINART, C. M.; VIEIRA, A. A. H. *tufA* gene as molecular marker for freshwater Chlorophyceae. **Algae**, v. 31, n. 2, p. 155–165, 2016.
- VOLKMAN, J. K.; BARRETT, S. M.; BLACKBURN, S. I.; MANSOUR, M. P.; SIKES, E. L.; GELIN, F. Microalgal biomarkers: A review of recent research developments. In: *Organic Geochemistry*, 5-7-7 pt 2., 1998, [...]. 1998. v. 29, p. 1163–1179.
- VU, D.-H.; WANG, K.-S.; BAC, B. H.; NAM, B. X. Humidity control materials prepared from diatomite and volcanic ash. **Construction and Building Materials**, v. 38, p. 1066–1072, 2013.
- WALLER, J. M.; MAIBACH, H. I. Age and skin structure and function, a quantitative approach (II): protein, glycosaminoglycan, water, and lipid content and structure. **Skin Research and Technology**, v. 12, n. 3, p. 145–154, 2006.

- WANG, H.-M. D.; CHEN, C.-C.; HUYNH, P.; CHANG, J.-S. Exploring the potential of using algae in cosmetics. **Bioresource technology**, v. 184, p. 355–362, 2015.
- WANG, Y.; CHEN, T. The biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin-producing green alga *Chlorella zofingiensis*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 2927–2932, 2008.
- WHITTAKER, R. H.; LIKENS, G. E.; LIETH, H. Primary Production of Inland Aquatic Ecosystems. *In*: LIETH, H.; WHITTAKER, R. H. **Primary Productivity of the Biosphere**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1975a. p. 185–202.
- WHITTAKER, R. H.; LIKENS, G. E.; LIETH, H. Scope and Purpose of This Volume. *In*: LIETH, H.; WHITTAKER, R. H. **Primary Productivity of the Biosphere**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1975b. p. 3–5.
- YANG, X.; DAI, X.; ZHANG, R.; SHAO, C.; GENG, S.; CHEN, G.; LIU, X.; WANG, G. Long-chain alcohols derived from the microalga *Monoraphidium*. **Advances in Energy Research**, v. 1, n. 2, p. 107–116, 2013.
- YEE, W. Microalgae from the Selenastraceae as emerging candidates for biodiesel production: a mini review. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 32, n. 4, p. 64, mar. 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11274-016-2023-6>>.
- YODER, A. D.; OLSON, L. E.; HANLEY, C.; HECKMAN, K. L.; RASOLOARISON, R.; RUSSELL, A. L.; RANIVO, J.; SOARIMALALA, V.; KARANTH, K. P.; RASELIMANANA, A. P. A multidimensional approach for detecting species patterns in Malagasy vertebrates. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. suppl_1, p. 6587–6594, 2005.
- ZANELLA, L.; ALAM, M. A. Extracts and bioactives from microalgae (sensu stricto): Opportunities and challenges for a new generation of cosmetics. **Microalgae Biotechnology for Food, Health and High Value Products**, p. 295–349, 2020.
- ZELLER, M. A.; HUNT, R.; JONES, A.; SHARMA, S. Bioplastics and their thermoplastic blends from *Spirulina* and *Chlorella* microalgae. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 130, n. 5, p. 3263–3275, 2013.
- ZERRES, S.; STAHL, W. Carotenoids in human skin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1865, n. 11, p. 158588, 2020.

- ZHANG, J.; LIU, L.; REN, Y.; CHEN, F. Characterization of exopolysaccharides produced by microalgae with antitumor activity on human colon cancer cells. **International journal of biological macromolecules**, v. 128, p. 761–767, 2019.
- ZHAO, G.; LIU, L.; LI, C.; ZHANG, T.; YAN, T.; YU, J.; JIANG, X.; JIAO, F. Construction of diatomite/ZnFe layered double hydroxides hybrid composites for enhanced photocatalytic degradation of organic pollutants. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 367, p. 302–311, 2018.
- ZIELINSKI, D.; FRACZYK, J.; DEBOWSKI, M.; ZIELINSKI, M.; KAMINSKI, Z. J.; KREGIEL, D.; JACOB, C.; KOLESINSKA, B. Biological activity of hydrophilic extract of *Chlorella vulgaris* grown on post-fermentation leachate from a biogas plant supplied with stillage and maize silage. **Molecules**, v. 25, n. 8, p. 1790, 2020.
- ZMASEK, C. M.; GODZIK, A. This Deja vu feeling—analysis of multidomain protein evolution in eukaryotic genomes. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 11, p. e1002701, 2012.

2 HIPÓTESES E OBJETIVOS

2.1. Hipóteses

A) A espectrometria de massas por MALDI-TOF pode ser utilizada como uma ferramenta na distinção de microalgas através da análise de moléculas na faixa de massas entre 2.000 e 20.000 Da. O perfil dos espectros dos compostos intracelulares deve permitir o estabelecimento de um banco de dados, com espectros de referência, que possibilite a identificação de amostras através da comparação da similaridade entre os espectros.

B) Cultivos de microalgas realizados sob diferentes condições abióticas podem apresentar uma variação na composição química das células, o que pode afetar a identificação delas através dos espectros obtidos. Por outro lado, a utilização de diferentes equipamentos na obtenção dos espectros não deve afetar esse tipo de identificação.

C) A especificidade das relações entre algas e bactérias está relacionada a compostos químicos envolvidos na comunicação desses organismos. Sendo interações que se estabeleceram através de processos evolutivos, espera-se que espécies algais próximas apresentem respostas semelhantes à interação com uma mesma população bacteriana, quando comparadas com outras espécies. Assim, a produção de compostos intracelulares das microalgas, detectados por espectrometria de massa por MALDI-TOF, deve auxiliar na complexa delimitação específica do grupo em um contexto ecológico.

2.2. Objetivos

A) Estabelecer um banco de dados *on-line*, disponível sob demanda para o uso acadêmico, em um *software* livre, de espectros de referência de 23 cepas axênicas de microalgas de água doce, que possibilite a identificação de amostras a nível de cepa, espécie e gênero.

B) Identificar um método de distância, através de testes iterativos, que forneça a melhor combinação de coeficientes para as análises de NMDS e PERMANOVA, como forma de validar a capacidade do banco de dados para a distinção de cepas e espécies.

C) Verificar a capacidade de identificação, com o método selecionado, para amostras de culturas realizadas em diferentes condições de volume, luminosidade,

temperatura, pH e disponibilidade de nutrientes, bem como espectros obtidos em diferentes equipamentos.

D) Averiguar a capacidade de diferenciação das células microalgais, em cultivos axênicos e em cocultivos com bactérias, através dos espectros de massas obtidos com MALDI-TOF.

E) Identificar se as respostas metabólicas intracelulares das células algais quando cocultivadas com bactérias isoladas, em dois tratamentos distintos, são semelhantes entre indivíduos espécies próximas.

F) Avaliar a delimitação específica, através de espectros de massas por MALDI-TOF, comparando cultivos axênicos e cocultivos, com análises filogenéticas, a fim de fornecer dados que contribuam para uma abordagem integrativa da taxonomia do grupo.

3 CAPÍTULO 1

MALDI-TOF MS ONLINE DATABASE FOR MICROALGAE IDENTIFICATION IN OPEN-SOURCE SOFTWARE

3.1. Abstract

Correct microalgal species identification is crucial for both ecological and economic applications. Classic morphological methods can lead to misidentifications due to the plasticity and simplicity of these organisms. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) represents a consistent alternative to help overcome this problem. However, the absence of reference spectra databases for microalgae hinders the application of this technique. Here, we acquired spectra of 23 different microalgae strains with biological and technical replicates within a mass range of 2 to 20 kDa using α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (HCCA). Spectra were loaded and treated in the open-source software R (4.2.1) to assemble an in-house database. We found the best statistical method for dissimilarity analysis by iterative tests and used this method to validate our script and database for microalgae identification. We obtained highly reliable strain differentiation. At the strain level, all the identifications were successful, even with differences in culture conditions and equipment. At species level, most identifications were correct, but some method adjustment and database expansion may improve the results. For genus level, our results were capable of distinguishing the one with more representants, which indicates that the expansion of the database could improve the identification at higher taxonomic levels. This first MALDI-TOF spectra database for microalgae and our script in open-source software proved to be promising tools for microalgae identification.

Keywords: Microalgae; Identification; Mass Spectra; Phytoplankton; Taxonomy

3.2. Introduction

The phytoplankton is a community of photoautotrophic organisms that inhabit open waters, have limited mobility, and have systems of buoyancy. It is composed of cyanobacteria (prokaryotes) and microalgae (a polyphyletic eukaryotic group)¹⁻³. They are key producers in both freshwater and marine ecosystems and constitute the main

source of organic matter in those systems. Thus, on a global scale, they fix a great amount of carbon dioxide through photosynthesis, reducing its concentration in the atmosphere and consequently producing most of the atmospheric oxygen^{4,5}. So, impacts on phytoplanktonic communities can directly affect not only the aquatic food webs and biota but also biogeochemical cycles and climate changes.

Some of these organisms can produce toxins (e.g., cyanobacteria and dinoflagellates, for example) that can be harmful to the aquatic biota and other animals, including humans⁶. On the other hand, many cyanobacteria and microalgae biomasses, or metabolites, can be used in human supplementary nutrition, cosmetics, medicines, colorants, fuels, and others^{7–10}. The market for microalgal products reached an estimated value of US\$ 32.6 Billion in 2017 and is projected to reach US\$ 53.43 Billion by 2026¹⁰.

Either for the study of their ecological functions, or for biotechnological applications, the correct identification of these organisms is necessary¹¹. The genus *Scenedesmus*, for example, contained 74 recognized species in 2016¹², and currently comprises 159 accepted species¹³. This group is widely studied for its lipidic content, which can be used in biodiesel production. However, the morphological identification of the species of this group is very difficult¹², and the lipid content of the cells presents variation among species¹⁴. Thus, the morphological simplicity has been a barrier to a practical identification of microalgae, and the occurrence of phenotypical plasticity leads to misidentification based only on the morphology^{15–18}.

Methods based on the sequencing of specific molecular genetic markers and, more recently, genomes are way more reliable, but they can be expensive, laborious, time consuming, and unfortunately, sometimes inconclusive for species identification^{19,20}. In most cases the taxonomy has been done using only morphological

and genetic data²¹. Therefore, taxonomists have suggested the use of an integrative approach to identify these microorganisms, incorporating ultrastructural, physiological, ecological, molecular genetics, phylogeny, and biochemical features along with the morphological data^{18,22}.

In the biochemical field, there are several spectroscopic (e.g., FTIR^{23,24}, Raman^{25,26}, NMR²⁷) and spectrometric (e.g., HPLC²⁸, GC²⁹, LAESI³⁰) techniques that are being used for algal metabolomics. These data could improve the resolution of the hidden diversity of microalgae³¹, but there is a lack of more complete databases and validation of the methods for these microorganisms^{16,32}.

Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) is a method of soft ionization of solid samples with a low rate of analyte fragmentation, producing spectra that cover high-mass molecules³³. Many studies have demonstrated the possibility of the use of MALDI-TOF mass spectra for a satisfactory discrimination of species of animals³⁴ and plants³⁵, and strains of fungi^{36,37}, bacteria^{38,39}, viruses^{40,41}, and microalgae^{16,19,20,31,42}. The practicality and cost of this method are the main reasons for its use in research and clinical laboratories, hospitals, and industries.

Although the practicality of MALDI-TOF MS is similar to that of genetic molecular markers, the method requires a well-established and curated database for correct species identification^{19,36,43}. The main manufacturers of MALDI-TOF equipment have commercial databases for the identification of bacteria, viruses, and fungi. An on-line database of spectra (MALDI-UP), that includes 4344 entries (in the version of 04/07/2023), is being constructed with the collaborative work of researchers spread all over the world. This database contains information for food quality control, clinical applications, medical and veterinary diagnosis, and others⁴⁴. Another database for

microorganism identification is maintained, curated, and organized by the Public Health Agency of Sweden (Folkhälsomyndigheten)⁴⁵, and offers free access to MALDI-TOF spectra to complement the Bruker Biotyper® database.

However, none of these databases, commercial and/or collaborative, contain any microalgae spectra. Therefore, here we intended to initiate a curated MALDI-TOF mass spectra database for microalgae identification and validate its use.

3.3. Material and Methods

3.3.1. Strains

The construction of the in-house database was performed using a total of 23 axenic strains of microalgae from 16 species (**Table 3.1**). All selected strains are maintained in the Freshwater Microalgae Culture Collection – UFSCar (Portuguese acronym: CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853). The three strains assigned as "unidentified" (447, 138 and 322) are possibly new species that are still undescribed.

3.3.2. Growth Curves Determination

Cultures for growth curve were inoculated, in triplicates, in glass tubes (100 × 16 mm) with a screw cap and PTFE liner. All cultures were set to start with 3.0×10^4 cells mL⁻¹ (counted in a Muse® Cell Analyzer) with a final volume of 6.0 mL per tube. All tubes are maintained with the caps slightly loose, allowing gases to exchange. Cultures were performed in WC medium⁴⁶, pH 7.0, under controlled conditions at 23 ± 1 °C, mean light intensity of 175 $\mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LED 2700K) and 12:12h light/dark cycle. Every handling was performed under sterile conditions to maintain the axenic condition of the cultures.

The growth of the microalgae was measured by optical density analysis directly in the culture tubes at 680 and 750 nm⁴⁷ in a HACH DR 5000

spectrophotometer. Before reading, each tube was shaken (IKA® MS3 basic) at 3000 rpm for, approximately, 5 seconds. This time was set based on a visual inspection of the culture homogenization, and, when necessary, this time was extended for a few more seconds. These measurements were taken daily in the first three days of growth and with maximum intervals of two days until reaching 28 days of growth.

To assess the maintenance of axenic conditions, all replicates were inoculated in separate tubes with WC medium added with peptone (250 mg L⁻¹) and glucose (250 mg L⁻¹).

Table 3.1. All microalgal strains used in this study are from the Freshwater Microalgae Culture Collection - UFSCar (Portuguese acronym CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853). RO = Roraima State, Brazil; SP = São Paulo State, Brazil; MG = Minas Gerais State, Brazil. Different superscripted letters indicate different counties in the same state.

Species	Strain	Origin (Year)	Geographic coordinates
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Korshikov 1953: 296	024	SP ^a (1979)	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
	003	SP ^a (1979)	22°12'20.6"S 47°52'37.6"W
<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953: 296	239	SP ^b (2010)	21°38'31.0"S 48°19'56.8"W
	333	RO (2011)	08°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda 1838: 197	578	SP ^c (2013)	21°50'27.0"S 46°52'57.8"W
	605	SP ^d (2013)	23°15'25.7"S 47°18'18.6"W
	277	MG (2011)	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> Komárková-Legnerová 1969: 87	278	MG (2011)	20°32'01.0"S 46°31'32.9"W
<i>Ankistrodesmus</i> sp. Corda 1838	131	SP ^e (1992)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Chlorolobion braunii</i> (Nägeli) Komárek 1979: 255	137	SP ^e (1992)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) Möbius 1894: 331	087	SP ^e (1987)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
<i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West 1894: 16	516	SP ^f (2012)	23°39'19.8"S 46°37'17.1"W
	047	SP ^g (2008)	21°59'08.5"S 47°52'50.6"W
<i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866: 64	613	SP ^h (2013)	23°29'55.3"S 47°22'45.2"W
	630	SP ⁱ (2013)	23°49'17.5"S 48°36'02.9"W
	470	SP ^j (2012)	21°48'38.0"S 47°16'26.4"W
<i>Messastrum gracile</i> (Reinsch) T.S.Garcia 2021	622	SP ^k (2013)	23°02'28.8"S 48°03'15.9"W
<i>Coelastrum sphaericum</i> Nägeli 1849: 98	060	SP ^g (1986)	21°59'09.7"S 47°52'35.3"W
<i>Hariotina reticulata</i> P.A.Dangeard 1889: 163	326	RO (2011)	08°35'17.9"S 63°37'12.3"W
<i>Dictyosphaerium</i> sp. Nägeli, 1849	663	SP ^l (2014)	20°20'59.7"S 49°10'35.5"W
Unidentified Selenastraceae	447	SP ^m (2012)	22°19'01.0"S 48°03'05.4"W
Unidentified picoplankton	138	SP ^e (1992)	21°36'28.5"S 47°46'13.1"W
Unidentified picoplankton	322	RO (2011)	08°24'18.6"S 63°27'13.6"W

3.3.3. Cultures and Samples Preparation for MALDI-TOF

Experimental cultures were performed using the same conditions described previously for the growth curves, but here each strain was cultured in five replicates. The optical density of each tube was measured and compared with the expected value for the exponential growth phase.

Samples were taken between the middle and end stages of exponential growth, transferred to 15 mL Falcon-type tubes, and centrifuged in a Heraeus Megafuge® 2.0 with a relative centrifugal force (RCF) of 3500 x *g* for 15 min. The supernatants were discarded, and the algal pellets were stored at -80 °C. Posteriorly, all the samples were lyophilized (Heto Drywinner) and re-stored at -80 °C until the analysis in MALDI-TOF.

Prior to spectra acquisition, we randomly selected three replicates of each strain, and the algal cells were resuspended in aqueous solution containing acetonitrile (ACN) and 0.1% trifluoroacetic acid (TFA), in a 50:50 v/v ratio, to a final concentration of 10 mg L⁻¹. Then, sample solution was mixed at 1:1 (v/v) with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix, at 10 mg mL⁻¹, dissolved in the same solvent mixture.

Afterwards, the obtained solutions (matrix + algae) of each replicate were deposited in triplicates on a MALDI ground steel target plate (MTP 384, Bruker Daltonics®) in a volume of 2 μ L per spot. Samples dried on the plate at room temperature.

3.3.4. Spectra Acquisition

The MALDI AutoFlex Max (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany) was configured and operated with the software Flex Control 3.4 from the same manufacturer. Spectra were acquired in the mass range of 2,000 to 20,000 Da.

Calibration was performed with the Protein Calibration Standard I (Insulin, $[M+H]^+$ at m/z 5734.51, Ubiquitin I, $[M+H]^+$ at m/z 8565.76, Cytochrome C, $[M+H]^+$ at m/z 12,360.97 and $[M+2H]^{2+}$ at m/z 6180.99, and Myoglobin, $[M+H]^+$ at m/z 16,952.30 and $[M+2H]^{2+}$ at m/z 8476.65) from Bruker Daltonics®, prepared using the same protocol used for the algae.

Each strain had culture triplicates, and each culture replicate was measured in 3 spots (sample replicate). The spectrum of each sample replicate is a summary of 1,000 spectra (number of laser shots). Thus, the individual spectrum of each strain is the result of 9,000 spectra (**Table 3.2**).

Table 3.2. Organization of biological¹, technical² and acquisition³ replicates.

Strain	Culture Replicates ¹	Sample Replicates ²	Laser Shots ³
000	R1	R1.1	1,000
		R1.2	1,000
		R1.3	1,000
	R2	R2.1	1,000
		R2.2	1,000
		R2.3	1,000
	R3	R3.1	1,000
		R3.2	1,000
		R3.3	1,000

Bruker Smartbeam™ laser generate positively charged ions at a 2 kHz frequency, and the PIE (Pulsed Ion Extraction) was set with 450 ns and 8.01 kV lenses. The used voltage on the ion sources was 19.52 kV in the first and 17.76 kV in the second, and the separation was performed with TOF operating in linear mode. The power of the laser beams was set to 70%, with attenuations (laser offset) of 10%.

3.3.5. Spectra Treatment

We imported the data into the open-source software R (version 4.2.1) using the MALDIquantForeign package⁴⁸. Then, we performed a quality control of the spectra

with MALDIrppa package⁴⁹, and afterwards processed the spectra with MALDIquant package⁵⁰.

The spectra processing steps were: **1)** transformation of intensities with a square root transformation; **2)** (MALDIrppa) smoothing with the Wavelet method using a smoothing factor of 2.5; **3)** baseline removal with the SNIP (Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping) method with 105 iterations; and **4)** normalization of the intensities using the PQN (Probabilistic Quotient Normalization) method.

After processed we generated summary spectra for the culture replicates and strains using the function “averageMassSpectra”, from the MALDIquant package with the mean method.

3.3.6. In-House Spectra Database

The processed spectra were compiled into tables of intensity values, arranged with m/z values in rows and the different samples in columns. These data, in the database archive, were organized in three different tables, containing the summary spectra for the sample replicates, for culture replicates, or for strains. For each one of these tables, we included a correspondent metadata table with the classic taxonomy of each spectrum. These tables were stored in a database archive (.db extension) using the RSQLite⁵¹ and DBI⁵² packages.

The database archive (MALDI_CCMA_V1.db) will be hosted on the website of the Phycology Laboratory (in Portuguese: Laboratório de Ficologia – UFSCar www.ficologia.ufscar.br) and will be made available for consultation, upon request, for academic purposes. The database may be updated by adding new versions on the same website.

3.3.7. Database Validation and Identification Tests

We performed iterative tests of Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) followed by permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), using the *vegan* package⁵³. All methods of dissimilarity indexes, including the “vegdist” function, were evaluated with our data. This made it possible to find the method that presented the best combination of coefficients, i.e., a p-value <0.05, with higher values of R^2 and acceptable NMDS stress (under 0.2)⁵⁴. For hierarchical cluster analysis, we used the package *gplots*⁵⁵ in R. To choose the best clustering method, we used cophenetic correlation⁵⁶.

We have performed three different tests for database and method validation using the summary spectrum of each strain and the same method chosen for spectrum comparison, i.e., the one that presented the best fit coefficients in the database construction.

The first one was a blind test performed with two random samples that were selected from the extra samples of culture replicates. The selection was made by a third party and provided using "sample A" and "sample B" to be identified by our method.

Afterwards, we tested whether the spectra of the same and different strains obtained in a previous study (Mello et al., 2017) could be properly identified using our method. The cultures in this previous study were cultivated in the same medium and temperature, but with some important differences: the cultures were 25 times larger in volume; the light source was fluorescent lamps instead of warm white LED; and the biomass was harvested after 10 days and not 7 days (although both samplings were in the exponential phase of growth). Furthermore, sample preparation for the analysis was different since dry biomass concentration in the matrix was not standardized in

the previous study, and the equipment used was a MALDI AutoFlex Speed (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics®).

For the third test we used spectra obtained in a MALDI-TOF MS autoflex (Bruker Daltonics®), thus, a different equipment used to build our database. These are unpublished data, kindly provided by Dr. Naiara Archanjo, that are part of an ongoing study about phenotypic plasticity under different culture conditions. The 3 strains (one replicate of each strain) were cultured either in five times less nitrogen (200 μ M), seven degrees hotter (30°C), or using pH 8,5. Furthermore, the volume of culture was also 25 times larger and had a TRIS buffer.

The R script used for the microalgae identification of a new spectrum using our database is in supplementary material (**SM 3.1**) and will be hosted with the database on the laboratory website.

3.4. Results and Discussion

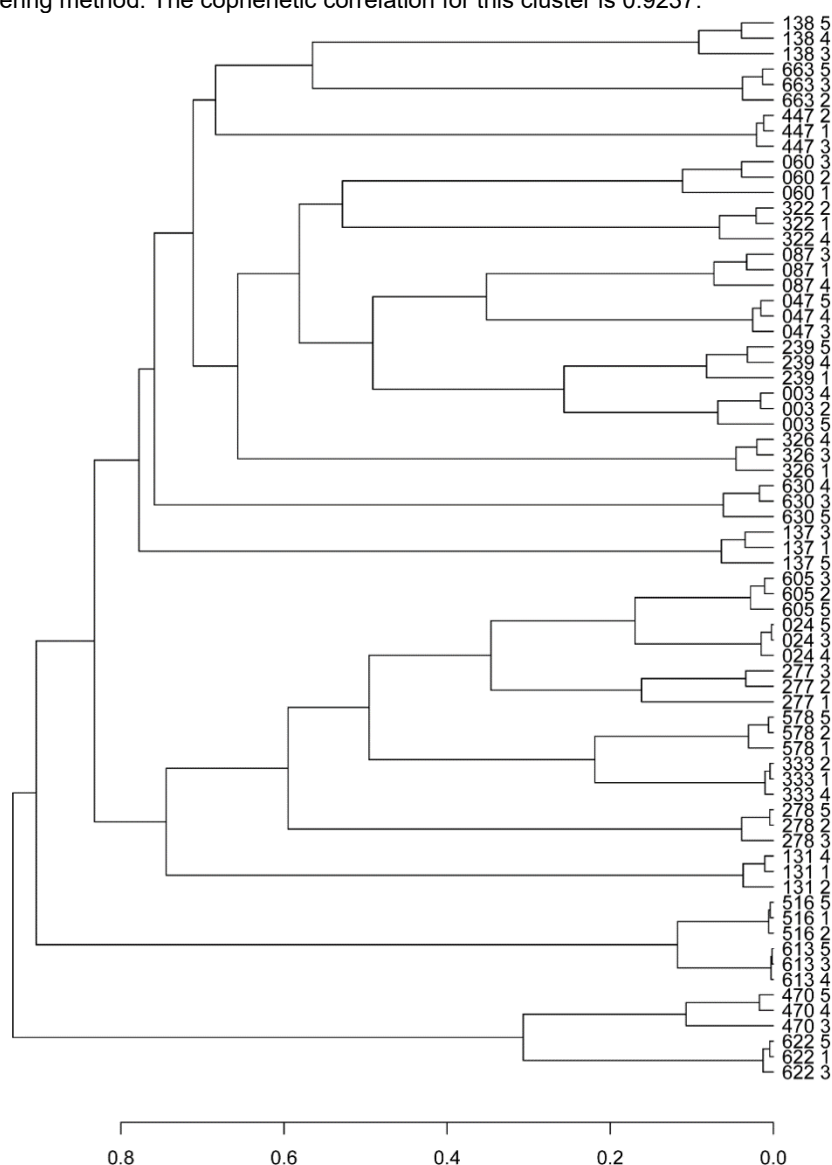
3.4.1. Obtained Spectra and Database Assemble

All the spectra obtained for database construction remained within the tolerance limits of the atypical score (*A* scores). This comparison included the calibration spectra, showing that the quality of the obtained data has a good resolution. Therefore, all the spectra were loaded into the database archive.

3.4.2. Database Validation

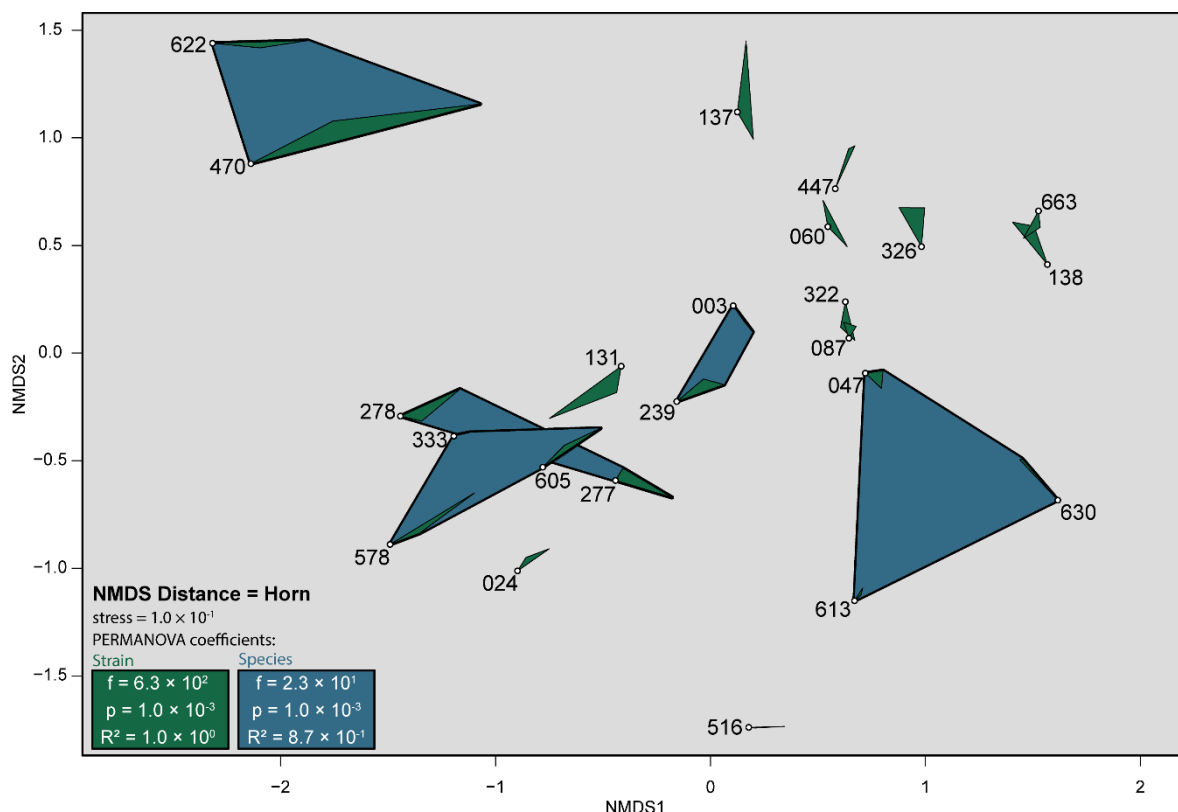
The cluster analysis using the spectra of culture replicates, independent of the distance and agglomeration methods used, was capable of differentiating all strains, i.e., the differences between the biological replicates (intra-strain variability), were lower than the inter-strain differences (**Figure 3.1**). All coefficient values yielded by the iterative tests can be found in the supplementary material (**SM 3.2**).

Figure 3.1. Cluster of biological replicates (different cultures of the strains). The first tree number of the labels refers to the CCMA-UFSCar strain code, and the number after this refers to the number of the culture replicate that was randomly selected for the spectra. This illustrative dendrogram was performed with the Horn distance method and the average clustering method. The cophenetic correlation for this cluster is 0.9237.



From the iterative tests using PERMANOVA, we found that the Horn distance is the method that yielded the best fit coefficients for both taxonomic levels of strains and species, with a significant p-value (< 0.05) and also provided a satisfactory stress value for the NMDS plot (**Figure 3.2**). Grouping strains in PERMANOVA explained 99.67% of the variability in the data ($R^2 = 0.9967$; pseudo-F = 6.3×10^2) and grouping species explained 86.88% of the variability ($R^2 = 0.8688$; pseudo-F = 2.3×10^1).

Figure 3.2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented.



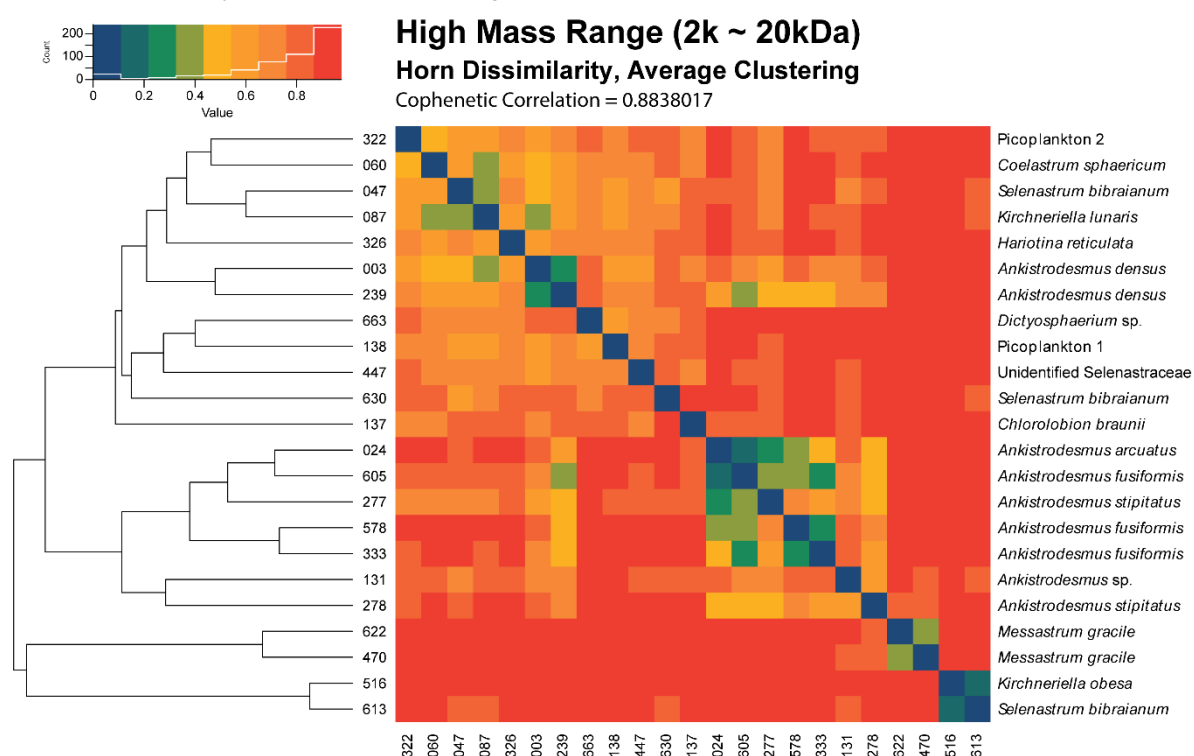
We also constructed a heatmap coupled with a dendrogram (Figure 3.3) to visualize the distance between strains. Most of the strains of the genus *Ankistrodesmus* have shown low dissimilarity and clustered into a clade. However, two strains of this genus (CCMA-UFSCar 003 and 239) clustered in a separate clade, despite a lower dissimilarity (heatmap) between these two and the other strains from this same genus. The strain 131 was morphologically assigned to the genus *Monoraphidium* (SM 3.3) but has been assigned to *Ankistrodesmus* by molecular analysis (data not shown), and our data corroborates this new assignment. Likewise, the strains of *M. gracile* (622 and 470) that are grouped together in a clade by genus are distant from strains from their former genus, *Selenastrum*¹⁵.

The strains of the genus *Selenastrum* were not grouped into a single clade. The strain 630 was not similar to any other strain, and the strains 613 and 047 were in different clades, but both clustered with strains of the genus *Kirchneriella* (516 and 087

respectively). Apparently, these two genera, *Selenastrum* and *Kirchneriella*, are difficult to separate even with molecular phylogenetic analysis⁵⁷.

The overall cluster did not reflect the traditional taxonomy of higher taxa after the family level. This may be caused by the low diversity of the chosen samples for higher levels in the present study, allied with problems with the traditional taxonomy of microalgae.

Figure 3.3. Heatmap of the Horn dissimilarity matrix, with dendrogram clustered using the average algorithm, between the summary spectra of each microalgal strain.



The strong cophenetic correlation coefficient indicates that the clustering algorithm used represents the original dissimilarities in the distance matrix appropriately.

3.4.3. Identification Tests

The spectra of the blind test samples were loaded into R software and treated with the same parameters as the reference spectra in our in-house database. The dissimilarity analysis with the reference spectra was made and returned the following results: sample A showed higher similarity (94.56%) with strain CCMA-UFSCar 131

and sample B (83.74%) with strain CCMA-UFSCar 663 (**SM 3.4**). These identifications were later confirmed as correct by the person who acquired the spectra.

For the second test, we chose the summary spectra of five strains from our previous study (Mello et al., 2017) to check the database reliability of identification using Horn distance. The strain CCMA-UFSCar 333 (*Ankistrodesmus fusiformis*) from the previous study was correctly identified, presenting a higher similarity (75.71%) with the reference spectrum of the same strain in our database. The following top similarities are all among reference strains that belong to the same genus (**Figure 3.4**), although not exactly from the same species.

Another sample from Mello et al. (2017), the spectra of the strain CCMA-UFSCar 137 (*Chlorolobion braunii*), presented 82.5% similarity with the same strain in the database.

We also tested strains that were not included in our reference database spectra. The strain CCMA-UFSCar 455 (*C. braunii*) from the previous study presented a higher similarity (41.13%) with the spectrum of the strain 137, which belongs to the same species, but was isolated from a different place in previous years. The same kind of test was performed with the strain CCMA-UFSCar 602 (*Selenastrum bibraianum*), which is not present in the database but has conspecific representatives. However, the higher similarity observed for this strain (68.47%) was with a strain of another species: CCMA-UFSCar 087 *Kirchneriella lunaris*, followed by the strain *S. bibraianum* CCMA-UFSCar 47 (59,75%). These results also indicate a taxonomic confusion between these genera, as we have discussed above.

We still tested the strain CCMA-UFSCar 325 (*Monoraphidium pseudobraunii*) which is not represented nor has a conspecific strain in the database. As a result, we

had a very low similarity compared to the reference spectra, with the most similar strain being *A. densus* CCMA-UFSCar 003 with 37.7% similarity.

Figure 3.4. Script output with the identification, by Horn dissimilarity, of sample 333 from Mello et al. (2017) using the in-house reference spectra database. The table is ordered from the lowest dissimilarity to the highest, showing that the top nine similarities with the tested spectrum are all of strains that are classified in the same genus.

The spectrum of your sample (333) shows
higher similarity (75.71%) with the strain 333

	Strain	Dissimilarity	Species
1	333	0.2428537	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
2	239	0.3180464	<i>Ankistrodesmus densus</i>
3	024	0.4205245	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>
4	578	0.4258376	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
5	605	0.4329932	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
6	277	0.5571251	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
7	003	0.5614227	<i>Ankistrodesmus densus</i>
8	278	0.7227078	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
9	131	0.7245062	<i>Ankistrodesmus</i> sp.
10	087	0.7263601	<i>Kirchneriella lunaris</i>
11	322	0.7617085	Picoplankton 2
12	060	0.7645491	<i>Coelastrum sphaericum</i>
13	047	0.7714773	<i>Selenastrum bibraianum</i>
14	326	0.8114524	<i>Hariotina reticulata</i>
15	447	0.8132891	Unidentified Selenastraceae
16	138	0.8177564	Picoplankton 1
17	613	0.8226285	<i>Selenastrum bibraianum</i>
18	137	0.8239440	<i>Chlorolobion braunii</i>
19	516	0.8249318	<i>Kirchneriella obesa</i>
20	630	0.8508690	<i>Selenastrum bibraianum</i>
21	663	0.8572699	<i>Dictyosphaerium</i> sp.
22	470	0.9145136	<i>Messastrum gracile</i>
23	622	0.9444569	<i>Messastrum gracile</i>

The blind identification test of the strain cultured with a lower nitrogen concentration correctly identified the sample as the strain CCMA-UFSCar 003 (*A. densus*) with a similarity of 87.47%. The HCCA matrix is mainly used to obtain spectra

of proteins and peptides, so nitrogen concentration is expected to affect these types of biomolecules^{58–60}. Thus, even after changing a macronutrient concentration that can interfere with the production of these metabolic compounds, the present method could still properly recognize the strain.

The strain cultured at a higher temperature was assigned to CCMA-UFSCar 087 (*K. lunaris*) with 60.29% similarity. The correct identification is CCMA-UFSCar 345 (*K. obesa*), a strain not included in the database. Although our method has correctly identified the genus, the conspecific representative in the database of the correct strain, the CCMA-UFSCar 516, presented a very low similarity (9.84%) with the CCMA-UFSCar 345. Temperature is an important environmental factor that have well documented⁶¹ effects on microalgal pigments, lipids, growth rate, and cell size; usually high temperatures lead to smaller cells⁶¹. Teoh et al.⁶² (2004) also report a protein content reduction in microalgae at higher temperatures, which could have affected the identification with spectra obtained using the HCCA matrix.

Nonetheless, the strain of the alkaline condition was correctly identified as CCMA-UFSCar 087 (*K. lunaris*), with a similarity of 80.74% to the reference spectrum. This supports our findings that this method provides extremely reliable strain identification even under varying culture conditions.

These results suggest the possibility of using this method in economic applications, especially when stressing conditions are employed to stimulate the microalgae to produce target compounds.

One of the major current applications of MALDI-TOF MS is in the clinical field, where it is mainly used for bacterial and fungal identification. For this purpose, the utilization of reference spectra databases is crucial. Bacterial species and/or genotypes of clinical interest were successfully identified using expanded databases^{63–}

⁶⁵. Therefore, we expect that increasing our database will lead to even better identification of microalgae strains and species.

Fungi identification also depends on the expansion of commercial databases^{66,67}. These improvements were found to yield faster and more reliable results, and De Carolis et al.⁶⁸ (2014) pointed out that the lack of reference spectra entangles species identification, especially for rare species. In our study, the low number of *Selenastrum* strains could have hampered its identification as a concise group.

In the virology field, we found the same pattern as other studies regarding the databases of reference spectra. Only a few published studies providing databases for viruses were found, and they successfully identified the presence of viruses in clinical samples^{69,70}. The pandemic outbreak of SARS-CoV-2 also takes place in the applicability of the MALDI-TOF MS in the disease diagnosis, with effective identification of the virus^{41,71}. These authors also claim that the identification is mainly limited by the reference spectra in the available databases, which still have a limited representation of the biochemical diversity of the virus.

Although there is a great demand for other applications than clinical, the availability of this type of reference spectrum is very scarce⁴⁴. The MALDI-UP on-line platform entries for algae (considering Division Chlorophyta) only count with spectra for organisms from the genus *Prototheca*¹⁹, which is an achlorophyllous parasitic alga with clinical interest.

Studies with yeasts of agricultural interest (e.g., for wine production)⁷² also suggest the need for expansion of the existing databases for a more accurate identification of these organisms. Moreover, ecological studies are also hampered by the shortage of reference data⁷³.

Normand et al.³⁷ (2017) constructed an in-house database that achieved better identification results when compared to the commercial Bruker database but still requires optimization due to the problematic identification of rare species. This agrees with our findings, where the results of identification tests for species lead to misidentifications when there are few strains. Additionally, the available methods in the software that uses the commercial databases are designed for bacteria identification and may not be suitable for other groups like fungi³⁷. This can also be true for microalgae, suggesting the need to find a suitable method for them.

None of these studies performed the identification of the samples using methods that differed from the workflow included in the software of the commercial databases. Here, we have shown that the utilization of dissimilarity analysis could provide highly reliable identification with the spectra comparison supported by significant statistical coefficients.

Besides that, among all these studies that address the utilization of spectra databases for organism identification, the expansion of data on reference spectra is unanimous and unavoidable for the improvement of this application. So, the establishment of a novel in-house database of microalgal strains is a crucial first step for the beginning of the applications of this method with these organisms.

The use of open-source software for the creation of the database and to run the analysis is a powerful choice for more accessible information that allows easier communication between the most different researchers. And the inclusion of a script that can be modified according to the needs of each study or directly used to test the identification of unknown strains is an additional tool that favors this knowledge sharing and could lead to faster improvements of the method.

The comparison with the spectra of our previous study and cultivated in different conditions not only showed a reliable capacity for identification when the tested strain was in the database but also indicated that even with different equipment and differences in the culture condition and sample preparation, it was still capable of retrieving satisfactory results.

Some problematic identification, like some genus differentiation, points to the necessity of some adjustment in the methods, like the utilization of peak selection rather than the whole mass spectrum. However, we believe that the expansion of the database could also improve identification. For example, this problem was not found for the genus *Ankistrodesmus*, which has three times more representatives in the database than the genus *Selenastrum*.

Furthermore, including other mass ranges may be helpful, and this is being tested to improve the database and sample identification. The low mass range, that is from 400 to 2,000 Da, e.g., yielded 3.5 times more signals than the utilized high mass range (2 to 20 kDa), despite being an interval 11.25 times smaller. This implies that spectra in these mass ranges need to be more scrutinized to find adequate amounts of information that allow reliable identification.

3.4.4. Database Utilization

Finally, we create a script with the complete dissimilarity analysis that is ready to run new MALDI-TOF MS spectra comparisons with our in-house database and that can be used with the open-source software R. This script will be available with the database archive on the laboratory website.

3.5. Conclusions

Overall, our in-house database demonstrated satisfactory capacity for identifying and classifying all tested strains. For species-level identification, certain

tests with *S. bibraianum* strains exhibited divergence, highlighting the need for method adjustments. Nevertheless, the majority of tests using spectra from previous work or blind samples yielded the expected classification of strain or species, with a similarity threshold of 40% proving effective. To further enhance identification and classification capacity, future iterations of our method will include additional strains from diverse groups, progressively expanding the present database.

3.6. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the funding agencies CNPq to the grant to RVM (141131/2017-9) and to ILB (427777-2018/6). We are also grateful to Prof. Daniel Rodrigues Cardoso for the usage of MALDI AutoFlex Max (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics®) supported by FAPESP (17/01189-0), to Dr. Sinara Teixeira do Brasil Moraes for the spectra acquisition and blind test collaboration, to Prof. Ana Teresa Lombardi for the use of cell counter, to Dr. Naiara Archanjo for providing three unpublished spectra for the third identification test, and to Prof. Edson Rodrigues-Filho for the use of the MALDI-TOF MS autoflex (Bruker Daltonics®) to acquire these three spectra.

3.7. Supplementary Materials

SM 3.1. R script for identification using the database.

```
#=====
# Packages -----

{
  library(MALDIquant)
  library(MALDIquantForeign)
  library(DBI)
  library(dplyr)
  library(gplots)
  library(gridExtra)
  library(MALDIrppa)
  library(paletteer)
  library(RSQLite)
  library(vegan)
} # Loading necessary packages to run this script

#=====
#----- High Masses -----
#-----
#=====
# Connecting -----

# Set the directory with your necessary files (e.g., database file and spectra to be
identified)

setwd("URL")

# Creating object connected with the database archive
MALDISpectra.db <- dbConnect(RSQLite::SQLite(), "MALDISpectra.db")

# Listing tables in the database
dbListTables(MALDISpectra.db)

dbListFields(MALDISpectra.db, "MALDI.2k_20k.by.strain")

# Loading Spectra Table -----

# Setting an object with one of the tables from the database
HighMass.Strain.byColumn <- dbGetQuery(MALDISpectra.db, "select * from
'MALDI.2k_20k.by.strain'")
HighMass.Strain.byColumn <- sqlColumnToRownames(HighMass.Strain.byColumn, row.names
= NA)

# head(HighMass.Strain.byColumn[,1:5])

HighMass.Cultures.byColumn <- dbGetQuery(MALDISpectra.db, "select * from
'MALDI.2k_20k.by.cultures'")
HighMass.Cultures.byColumn <- sqlColumnToRownames(HighMass.Cultures.byColumn,
row.names = NA)

# head(HighMass.Cultures.byColumn[,1:5])

# Loading the classification table -----

# Complete classification with separated reading replicates [classification_read]
classification_by.read <- dbGetQuery(MALDISpectra.db, "select * from
'Taxonomy.by.read'")
classification_by.read <- sqlColumnToRownames(classification_by.read, row.names = NA)

# Complete classification with separated culture replicates
[classification_by.culture]
classification_by.culture <- dbGetQuery(MALDISpectra.db, "select * from
'Taxonomy.by.culture'")
```

```

classification_by.culture      <-      sqlColumnToRownames(classification_by.culture,
row.names = NA)

#      Complete      classification      with      separated      strains      replicates
[classification_by.strain]
classification_by.strain      <-      dbGetQuery(MALDISpectra.db,      "select      *      from
'Taxonomy.by.strain'")
classification_by.strain <- sqlColumnToRownames(classification_by.strain, row.names
= NA)

# Disconnecting the Database -----

dbDisconnect(MALDISpectra.db)

#=====
# Editing extracted tables from the database -----

# Transpor tabela para organizar os dados em linhas para as análises
HighMass.Strain.byRow <- as.data.frame(t(HighMass.Strain.byColumn))
HighMass.Cultures.byRow <- as.data.frame(t(HighMass.Cultures.byColumn))

#=====

#-----
#----- Identifying custom sample with reference database -----
#-----
#=====
# Inserting your sample -----

sua.cepa <- "NAME"

# Espectro Cru em Arquivo fid -----

nova.amostra <- import(file.path("URL"))

# nova.amostra <- import(file.choose())

# ATENÇÃO: Lembre-se de conferir o número de espectros considerados para o
#          cálculo do espectro médio.

# Processing your sample spectra -----

# Parameters
{
  thScale <- 2.5 # Smoothing
  ite <- 105 # Baseline correction
  SigNoi <- 2 # Peak extraction
  hws <- 20 # Peak extraction
  tol <- 0.003 # Peak binning
}

sc.results.nova.amostra <- screenSpectra(nova.amostra)
summary(sc.results.nova.amostra)

plot(sc.results.nova.amostra, labels = TRUE)

spectra.nova.amostra <- sc.results.nova.amostra$fspectra # Filtered list of mass
spectra

spectra.nova.amostra.T1 <- transfIntensity(spectra.nova.amostra, fun = sqrt)
spectra.nova.amostra.T2 <- wavSmoothing(spectra.nova.amostra.T1, method = "Wavelet",
thresh.scale = thScale)
spectra.nova.amostra.T3 <- removeBaseline(spectra.nova.amostra.T2, method = "SNIP",
iterations = ite)
spectra.nova.amostra.T4 <- calibrateIntensity(spectra.nova.amostra.T3, method =
"PQN")

```

```

peaks.nova.amostra <- detectPeaks(spectra.nova.amostra.T4, SNR = SigNoi,
halfWindowSize = hws)
peaks.nova.amostra <- alignPeaks(peaks.nova.amostra, minFreq = 0.8, tolerance = tol)

# Mean spectra of your sample -----
{
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[1]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[1]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[2]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[2]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[3]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[3]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[4]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[4]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[5]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[5]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[6]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[6]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[7]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[7]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[8]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[8]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
  #
  spectra.nova.amostra.T4[[9]]@metaData$vltofCalibrationConstants[is.na(spectra.nova.
amostra.T4[[9]]@metaData$vltofCalibrationConstants)] <- 0
}

mean.nova.amostra <- averageMassSpectra(spectra.nova.amostra.T4[1:8], method =
"mean")

# Formatting the spectra of sample to comparison with the database -----

MALDI.nova.amostra <- data.frame(mean.nova.amostra@mass,
mean.nova.amostra@intensity)
colnames(MALDI.nova.amostra) <- c("m/z", "Intensity")

MALDI.nova.amostra.byRow <- as.data.frame(t(MALDI.nova.amostra[,2]))
colnames(MALDI.nova.amostra.byRow) <- round(MALDI.nova.amostra[,1], 2)
row.names(MALDI.nova.amostra.byRow) <- "Desconhecido"

#=====
# Loading Database table -----

reference.spectra <- HighMass.Strain.byRow

colnames(reference.spectra) <- round(as.numeric(colnames(reference.spectra)), 2)
row.names(reference.spectra) <- paste0(row.names(reference.spectra), ".db")

# Juntando Amostra com Espectros de Referência -----

identification <- bind_rows(reference.spectra, MALDI.nova.amostra.byRow)

identification.ordered <- identification %>%
select(order(as.numeric(colnames(identification))))

#=====
# Distance Matrix -----

```

```

identification.ordered.dist <- vegdist(identification.ordered, method = "horn", na.rm
= TRUE)

# Encontrando a Menor Dissimilaridade -----

matriz.identification.ordered.dist <- as.matrix(identification.ordered.dist)

diag(matriz.identification.ordered.dist) = NA

dist.data.frame <- as.data.frame(matriz.identification.ordered.dist)

#=====
# Results -----

# Plot message and table of dissimilarities in order -----

dissimilaridades <- data.frame(classification_by.strain$Strain,

dist.data.frame$`Desconhecido`[!is.na(dist.data.frame$`Desconhecido`)],
                             classification_by.strain$Specie)
colnames(dissimilaridades) <- c("Strain", "Dissimilarity", "Species")

dissimilaridades.ordenado                                     <-
dissimilaridades[order(dissimilaridades$Dissimilarity),]

indices <- tableGrob(dissimilaridades.ordenado)

par(mar = c(0, 0, 0, 0))
plot(x = 0:10, y = 0:10, ann = F, bty = "n", type = "n", xaxt = "n", yaxt = "n") +
  text(x = ((par("usr")[2]-0.4)*0.5),
       y = ((par("usr")[4]-0.4)*0.95),
       paste0("The spectrum of your sample (", sua.cepas, ") shows")) +
  text(x = ((par("usr")[2]-0.4)*0.5),
       y = ((par("usr")[4]-0.4)*0.90),
       paste0("higher similarity (",
              (1 - round(min(dist.data.frame$`Desconhecido`, na.rm = TRUE), 4))*100,
              "%) with the strain ",

unlist(strsplit(names(dist.data.frame)[which.min(dist.data.frame$`Desconhecido`)],
                split='.', fixed=TRUE))[1]
  ))
grid.arrange(indices, newpage = FALSE)

#-----
# Message in R console -----

{
  message(paste0("The spectra of your sample (", sua.cepas, ") shows"))
  message(paste0("lower dissimilarity (",
                 round(min(dist.data.frame$`Desconhecido`, na.rm = TRUE), 4),
                 "%) with the strain ",

unlist(strsplit(names(dist.data.frame)[which.min(dist.data.frame$`Desconhecido`)],
                split='.', fixed=TRUE))[1]
  ))
} # In form of Dissimilarity

{
  message(paste0("The spectra of your sample (", sua.cepas, ") shows"))
  message(paste0("higher similarity (",
                 (1 - round(min(dist.data.frame$`Desconhecido`, na.rm = TRUE),
4))*100,
                 "%) with the strain ",

unlist(strsplit(names(dist.data.frame)[which.min(dist.data.frame$`Desconhecido`)],

```

```

                                split='.', fixed=TRUE))[1]
    ))
} # In form of Similarity

#-----
# HeatMap -----
# Color pallet
{
  BlGrYeOrRe <- c("#1d4877", "#1b8a5a", "#fbb021", "#f68838", "#ee3e32")
}

# Inserting the name of your strains in the heatmap labels
{
  for.HM <- as.data.frame(as.matrix(identification.ordered.dist))
  names(for.HM) <- c((grep(".db", names(for.HM), value = TRUE)), sua.cepa)
  row.names(for.HM) <- c((grep(".db", names(for.HM), value = TRUE)), sua.cepa)
}

{
  heatmap.2(as.matrix(for.HM),
            dendrogram = "row",
            hclustfun = function(identification.ordered.dist)
              hclust(identification.ordered.dist, method = "average"),
            Rowv = TRUE,
            Colv = TRUE,
            trace = "none",
            col = BlGrYeOrRe,
            main = "Horn, Average (2k_20k)")
} # Without labels of dissimilarity

{
  heatmap.2(as.matrix(for.HM),
            cellnote = round(as.matrix(identification.ordered.dist), 2),
            notecex = 0.5,
            notecol = "black",
            dendrogram = "row",
            hclustfun = function(identification.ordered.dist)
              hclust(identification.ordered.dist, method = "average"),
            Rowv = TRUE,
            Colv = TRUE,
            trace = "none",
            col = BlGrYeOrRe,
            main = "Horn, Average (2k_20k)")
} # With labels of dissimilarity

#=====

```

SM 3.2. Coefficient values from NMDS and PERMANOVA iterative tests.

NMDS Stress		
Method		Stress
1	Manhattan	0.11213557
2	Euclidean	0.05798073
3	Canberra	0.10421134
4	Bray	0.09815262
5	Kulczynski	0.12979636
6	Jaccard	0.09815269
7	Gower	0.11504068
8	AltGower	0.11207677
9	Horn	0.10024074
10	Binomial	0.10908894

PERMANOVA Strains				
Method		Pseudo-F	P value	R²
1	Manhattan	47.52773	0.000999001	0.9578604
2	Euclidean	52.37745	0.000999001	0.9616124
3	Canberra	10.25620	0.000999001	0.8306560
4	Bray	42.74205	0.000999001	0.9533622
5	Kulczynski	41.21418	0.000999001	0.9517168
6	Jaccard	21.79360	0.000999001	0.9124575
7	Gower	11.81154	0.000999001	0.8496014
8	AltGower	47.52778	0.000999001	0.9578605
9	Horn	628.10598	0.000999001	0.9966821
10	Binomial	46.85299	0.000999001	0.9572795

PERMANOVA Species				
Method		Pseudo-F	P value	R²
1	Manhattan	9.503090	0.000999001	0.7289645
2	Euclidean	8.057416	0.000999001	0.6951592
3	Canberra	6.909497	0.000999001	0.6616498
4	Bray	12.523178	0.000999001	0.7799439
5	Kulczynski	13.344291	0.000999001	0.7906498
6	Jaccard	9.207662	0.000999001	0.7226800
7	Gower	8.106709	0.000999001	0.6964501
8	AltGower	9.503120	0.000999001	0.7289651
9	Horn	23.396058	0.000999001	0.8687927
10	Binomial	14.891365	0.000999001	0.8082284

SM 3.3. Microphotography in optical microscopy of the strain CCMA-UFSCar 131 (*Ankistrodesmus* sp.), cells were fixed with formalin 4%. Objective lens of 40x.



SM 3.4. Script outputs of the blind test identifications.

The spectrum of your sample (Sample A) shows higher similarity (94.56%) with the strain 131

	Strain	Dissimilarity	Species
1	131	0.05443999	<i>Ankistrodesmus</i> sp.
2	613	0.25995222	<i>Selenastrum bibraianum</i>
3	605	0.37325095	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
4	326	0.37670239	<i>Hariotina reticulata</i>
5	447	0.38777408	Unidentified Selenastraceae
6	663	0.39964941	<i>Dictyosphaerium</i> sp.
7	060	0.40395300	<i>Coelastrum sphaericum</i>
8	578	0.47874556	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
9	322	0.48067135	Picoplankton 2
10	630	0.48959065	<i>Selenastrum bibraianum</i>
11	239	0.49355561	<i>Ankistrodesmus densus</i>
12	470	0.51749474	<i>Messastrum gracile</i>
13	278	0.53561031	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
14	516	0.53776334	<i>Kirchneriella obesa</i>
15	024	0.53995087	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>
16	277	0.59474695	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
17	087	0.60909742	<i>Kirchneriella lunaris</i>
18	137	0.62418995	<i>Chlorobion braunii</i>
19	003	0.64595289	<i>Ankistrodesmus densus</i>
20	138	0.67681468	Picoplankton 1
21	333	0.68207578	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
22	622	0.71111702	<i>Messastrum gracile</i>
23	047	0.74701031	<i>Selenastrum bibraianum</i>

The spectrum of your sample (Sample B) shows higher similarity (83.74%) with the strain 663

	Strain	Dissimilarity	Species
1	663	0.1625947	<i>Dictyosphaerium</i> sp.
2	322	0.1923153	Picoplankton 2
3	239	0.2156894	<i>Ankistrodesmus densus</i>
4	613	0.2417060	<i>Selenastrum bibraianum</i>
5	470	0.2428712	<i>Messastrum gracile</i>
6	131	0.2615256	<i>Ankistrodesmus</i> sp.
7	060	0.2686896	<i>Coelastrum sphaericum</i>
8	630	0.3264294	<i>Selenastrum bibraianum</i>
9	003	0.3283579	<i>Ankistrodesmus densus</i>
10	087	0.3488828	<i>Kirchneriella lunaris</i>
11	447	0.3724860	Unidentified Selenastraceae
12	578	0.3819700	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
13	024	0.3865342	<i>Ankistrodesmus arcuatus</i>
14	278	0.4070581	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
15	516	0.4326275	<i>Kirchneriella obesa</i>
16	138	0.4413434	Picoplankton 1
17	605	0.4502522	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>
18	326	0.4503111	<i>Hariotina reticulata</i>
19	047	0.4932697	<i>Selenastrum bibraianum</i>
20	277	0.5037338	<i>Ankistrodesmus stipitatus</i>
21	622	0.5245488	<i>Messastrum gracile</i>
22	137	0.5802252	<i>Chlorobion braunii</i>
23	333	0.6375376	<i>Ankistrodesmus fusiformis</i>

3.8. References

1. Reynolds, C. S. *The Ecology of Phytoplankton. Ecology, Biodiversity and Conservation* (Cambridge University Press, 2006). doi:DOI: 10.1017/CBO9780511542145.
2. Cavalier-Smith, T. Evolution and relationships of algae: major branches of the tree of life. in *Unravelling the algae: The past, present, and future of algal systematic* 21–56 (2007).
3. Brodie, J. & Lewis, J. *Unravelling the algae: The past, present, and future of algal systematic. Unravelling the Algae: The Past, Present, and Future of Algal Systematics* (2007). doi:10.1201/9780849379901.
4. Whittaker, R. H., Likens, G. E. & Lieth, H. Primary Production of Inland Aquatic Ecosystems. in *Primary Productivity of the Biosphere* (eds. Lieth, H. & Whittaker, R. H.) 185–202 (Springer Berlin Heidelberg, 1975). doi:10.1007/978-3-642-80913-2_9.
5. Chapman, R. L. Algae: the world’s most important “plants”—an introduction. *Mitig. Adapt. Strateg. Glob. Chang.* **18**, 5–12 (2013).
6. Guleri, S. & Tiwari, A. Algae and ageing. in *Microalgae biotechnology for food, health and high value products* 267–293 (Springer, 2020).
7. Bux, F. & Chisti, Y. *Algae Biotechnology: Products and Processes*. (Springer, 2016).
8. Borowitzka, M. A., Beardall, J. & Raven, J. A. *The Physiology of Microalgae*. (Springer International Publishing, 2016).
9. Levine, I. & Fleurence, J. *Microalgae in health and disease prevention*. (Academic Press, 2018).
10. Alam, M. A., Xu, J.-L. & Wang, Z. *Microalgae biotechnology for food, health and high value products*. (Springer, 2020).
11. Borowitzka, M. A. Systematics, Taxonomy and Species Names: Do They Matter? BT - The Physiology of Microalgae. in (eds. Borowitzka, M. A., Beardall, J. & Raven, J. A.) 655–681 (Springer International Publishing, 2016). doi:10.1007/978-3-319-24945-2_24.
12. Zou, S. *et al.* How DNA barcoding can be more effective in microalgae identification: a case of cryptic diversity revelation in *Scenedesmus* (Chlorophyceae). *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).

13. Guiry, M. D. & Guiry, G. M. *AlgaeBase*. *AlgaeBase* (2023).
14. Sharma, T. & Chauhan, R. S. Comparative transcriptomics reveals molecular components associated with differential lipid accumulation between microalgal sp., *Scenedesmus dimorphus* and *Scenedesmus quadricauda*. *Algal Res.* **19**, 109–122 (2016).
15. Garcia da Silva, T. *et al.* 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* **17**, 1–19 (2017).
16. Mello, R. V., Meccheri, F. S., Bagatini, I. L., Rodrigues-Filho, E. & Vieira, A. A. H. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). *Algal Res.* **28**, 151–160 (2017).
17. Fawley, M. W. & Fawley, K. P. Identification of eukaryotic microalgal strains. *J. Appl. Phycol.* **32**, 2699–2709 (2020).
18. Darienko, T., Gustavs, L., Eggert, A., Wolf, W. & Pröschold, T. Evaluating the species boundaries of green microalgae (Coccomyxa, Trebouxiophyceae, Chlorophyta) using integrative taxonomy and DNA barcoding with further implications for the species identification in environmental samples. *PLoS One* **10**, e0127838 (2015).
19. Murugaiyan, J., Ahrholdt, J., Kowbel, V. & Roesler, U. 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**, 461–467 (2012).
20. Lee, H.-W. *et al.* Phylogenetic analysis of microalgae based on highly abundant proteins using mass spectrometry. *Talanta* **132**, 630–634 (2015).
21. Leliaert, F. *et al.* DNA-based species delimitation in algae. *Eur. J. Phycol.* **49**, 179–196 (2014).
22. Krivina, E. S. & Temraleeva, A. D. Identification problems and cryptic diversity of *Chlorella*-clade microalgae (Chlorophyta). *Microbiology* **89**, 720–732 (2020).
23. Moraes, G. P. de & Vieira, A. A. H. Fourier transform infrared with attenuated total reflectance applied to the discrimination of freshwater planktonic coccoid green microalgae. *PLoS One* **9**, e114458 (2014).
24. Domenighini, A. & Giordano, M. Fourier transform infrared spectroscopy of microalgae as a novel tool for biodiversity studies, species identification, and the

- assessment of water quality 1. *J. Phycol.* **45**, 522–531 (2009).
25. Heidari Baladehi, M. *et al.* Culture-free identification and metabolic profiling of microalgal single cells via ensemble learning of ramanomes. *Anal. Chem.* **93**, 8872–8880 (2021).
 26. Samek, O., Zemánek, P., Jonáš, A. & Telle, H. H. Characterization of oil-producing microalgae using Raman spectroscopy. *Laser Phys. Lett.* **8**, 701 (2011).
 27. Bisht, B. *et al.* The potential of nuclear magnetic resonance (NMR) in metabolomics and lipidomics of microalgae- a review. *Arch. Biochem. Biophys.* **710**, 108987 (2021).
 28. Hughes, A. H. *et al.* Exploring the Chemical Space of Macro- and Micro-Algae Using Comparative Metabolomics. *Microorganisms* vol. 9 (2021).
 29. Gauthier, L., Tison-Rosebery, J., Morin, S. & Mazzella, N. Metabolome response to anthropogenic contamination on microalgae: a review. *Metabolomics* **16**, 1–13 (2020).
 30. Stopka, S. A., Shrestha, B., Maréchal, É., Falconet, D. & Vertes, A. Metabolic transformation of microalgae due to light acclimation and genetic modifications followed by laser ablation electrospray ionization mass spectrometry with ion mobility separation. *Analyst* **139**, 5945–5953 (2014).
 31. Emami, K. *et al.* Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: an example using *Dunaliella*. *Sci. Rep.* **5**, 1–15 (2015).
 32. Decelle, J. *et al.* Phyto REF: a reference database of the plastidial 16S rRNA gene of photosynthetic eukaryotes with curated taxonomy. *Mol. Ecol. Resour.* **15**, 1435–1445 (2015).
 33. Lewis, J. K., Wei, J. & Siuzdak, G. Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry in peptide and protein analysis. *Encycl. Anal. Chem.* 5880–5894 (2000).
 34. Yssouf, A. *et al.* Identification of flea species using MALDI-TOF/MS. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **37**, 153–157 (2014).
 35. Mehta, A. & Silva, L. P. MALDI-TOF MS profiling approach: how much can we get from it? *Frontiers in plant science* vol. 6 184 (2015).
 36. Cassagne, C., Normand, A., l'Ollivier, C., Ranque, S. & Piarroux, R. Performance of MALDI-TOF MS platforms for fungal identification. *Mycoses* **59**, 678–690

- (2016).
37. Normand, A.-C. *et al.* Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol.* **17**, 1–17 (2017).
 38. Sandrin, T. R., Goldstein, J. E. & Schumaker, S. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrom. Rev.* **32**, 188–217 (2013).
 39. Giraud-Gatineau, A., Texier, G., Garnotel, E., Raoult, D. & Chaudet, H. Insights into subspecies discrimination potentiality from bacteria MALDI-TOF mass spectra by using data mining and diversity studies. *Front. Microbiol.* **11**, 1931 (2020).
 40. Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K. & Viridi, J. S. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front. Microbiol.* **6**, 791 (2015).
 41. Do, T., Guran, R., Adam, V. & Zitka, O. Use of MALDI-TOF mass spectrometry for virus identification: a review. *Analyst* (2022).
 42. Barbano, D. *et al.* Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *PLoS One* **10**, (2015).
 43. Keys, C. J. *et al.* Compilation of a MALDI-TOF mass spectral database for the rapid screening and characterisation of bacteria implicated in human infectious diseases. *Infect. Genet. Evol.* **4**, 221–242 (2004).
 44. Rau, J. *et al.* MALDI-UP—An internet platform for the exchange of MALDI-TOF mass spectra. *User Guid.* <http://maldi-up.ua-bw.de/Asp.foodControlAnim.Heal>. **2016**, 1–17 (2016).
 45. Folkhälsomyndigheten, P. H. A. of S. No Title. <https://spectra.folkhalsomyndigheten.se/spectra/welcome.action>.
 46. Guillard, R. R. L. & Lorenzen, C. J. YELLOW-GREEN ALGAE WITH CHLOROPHYLLIDE C. *J. Phycol.* **8**, 10–14 (1972).
 47. Griffiths, M. J., Garcin, C., van Hille, R. P. & Harrison, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. *J. Microbiol. Methods* **85**, 119–123 (2011).
 48. Gibb, S. MALDIquantForeign: import/export routines for MALDIquant. *R Packag. version 0.12* (2019).
 49. Palarea-Albaladejo, J., Mclean, K., Wright, F. & Smith, D. G. E. MALDIrppa:

- quality control and robust analysis for mass spectrometry data. *Bioinformatics* **34**, 522–523 (2018).
50. Gibb, S. & Strimmer, K. Maldiquant: A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. *Bioinformatics* **28**, 2270–2271 (2012).
 51. Müller, K., Wickham, H., David, A. J. & Falcon, S. 'SQLite'Interface for R [R package RSQLite version 2.0]. *Compr. R Arch. Netw.* (2017).
 52. Wickham, M. H. Package 'DBI'. (2015).
 53. Oksanen, J. *et al.* Package 'vegan'. *Community Ecol. Packag. version 2*, 1–295 (2013).
 54. Dexter, E., Rollwagen-Bollens, G. & Bollens, S. M. The trouble with stress: A flexible method for the evaluation of nonmetric multidimensional scaling. *Limnol. Oceanogr. Methods* **16**, 434–443 (2018).
 55. Warnes, M. G. R., Bolker, B., Bonebakker, L., Gentleman, R. & Huber, W. Package 'gplots'. *Var. R Program. tools plotting data* (2016).
 56. Saraçlı, S., Doğan, N. & Doğan, İ. Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. *J. inequalities Appl.* **2013**, 1–8 (2013).
 57. Silva, T. G. da. Biodiversidade de Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): características morfológicas e sequenciamento dos marcadores moleculares 18S rDNA, rbcL e ITS como base taxonômica tradicional. (2016).
 58. Akgül, F. Effects of nitrogen concentration on growth, biomass, and biochemical composition of *Desmodesmus communis* (E. Hegewald) E. Hegewald. *Prep. Biochem. Biotechnol.* **50**, 98–105 (2020).
 59. Daume, S., Long, B. M. & Crouch, P. Changes in amino acid content of an algal feed species (*Navicula* sp.) and their effect on growth and survival of juvenile abalone (*Haliotis rubra*). *J. Appl. Phycol.* **15**, 201–207 (2003).
 60. Zhila, N. O., Kalacheva, G. S. & Volova, T. G. Influence of nitrogen deficiency on biochemical composition of the green alga *Botryococcus*. *J. Appl. Phycol.* **17**, 309–315 (2005).
 61. Hu, Q. Environmental Effects on Cell Composition. *Handbook of Microalgal Culture* 83–94 (2003) doi:<https://doi.org/10.1002/9780470995280.ch5>.
 62. Teoh, M.-L., Chu, W.-L., Marchant, H. & Phang, S.-M. Influence of culture temperature on the growth, biochemical composition and fatty acid profiles of six Antarctic microalgae. *J. Appl. Phycol.* **16**, 421–430 (2004).

63. Petry, S. *et al.* Evaluation of MALDI-TOF MS and an expanded custom reference spectra database for the identification and differentiation of *Taylorella equigenitalis* and *Taylorella asinigenitalis*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **94**, 326–330 (2019).
64. Murugaiyan, J. *et al.* MALDI spectra database for rapid discrimination and subtyping of *Mycobacterium kansasii*. *Front. Microbiol.* **9**, 587 (2018).
65. Papalia, M. *et al.* Expansion and improvement of MALDI-TOF MS databases for accurate identification of *Achromobacter* species. *J. Microbiol. Methods* **172**, 105889 (2020).
66. Calderaro, A. *et al.* Identification of dermatophyte species after implementation of the in-house MALDI-TOF MS database. *Int. J. Mol. Sci.* **15**, 16012–16024 (2014).
67. Paul, S. *et al.* MALDI-TOF MS-based identification of melanized fungi is faster and reliable after the expansion of in-house database. *PROTEOMICS–Clinical Appl.* **13**, 1800070 (2019).
68. De Carolis, E. *et al.* Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. *J. Clin. Microbiol.* **52**, 1453–1458 (2014).
69. Calderaro, A. *et al.* Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry applied to virus identification. *Sci. Rep.* **4**, 1–10 (2014).
70. Calderaro, A. *et al.* Identification of different respiratory viruses, after a cell culture step, by matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Sci. Rep.* **6**, 1–13 (2016).
71. Rocca, M. F. *et al.* A combined approach of MALDI-TOF mass spectrometry and multivariate analysis as a potential tool for the detection of SARS-CoV-2 virus in nasopharyngeal swabs. *J. Virol. Methods* **286**, 113991 (2020).
72. Agustini, B. C., da Silva, G. A. & Bonfim, T. M. B. MALDI-TOF MS Supplementary database for species identification employing the yeast diversity encountered on southern Brazil grapes. *Folia Microbiol. (Praha)*. **63**, 685–693 (2018).
73. Sanitá Lima, M., Coutinho de Lucas, R., Lima, N., Polizeli, M. de L. T. de M. & Santos, C. Fungal community ecology using MALDI-TOF MS demands curated mass spectral databases. *Front. Microbiol.* **10**, 315 (2019).

4 CAPÍTULO 2

EVALUATION OF PLANKTONIC INTERACTIONS ON THE SPECIFIC DELIMITATION OF FRESHWATER MICROALGAE WITH MALDI-TOF MS

4.1. Abstract

Microalgae and bacteria interactions are one of the most important relationships in aquatic ecosystems. These highly adaptative interactions can be associated to the compounds produced by the microalgal cells, and it is expected that closely related algal species present similar responses when cocultured with the same bacteria. The differences in the algal metabolic production, induced by the bacterial presence, can be used to support the specific delimitation in an ecological context. In this scenario, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectra of cocultured microalgae and bacteria can retrieve valuable data to this application. The spectra of 18 strains, from eight species and three genera, were obtained in the mass range from 2 to 20 kDa with α -cyano-4-hydroxycinnamic acid matrix (HCCA). Each strain was cultured in three replicates for three treatments: one axenic and two cocultures with two different bacteria. Spectra data were loaded and treated in the open-source software R (4.3.1). Iterative tests were used to find the best dissimilarity methods for the statistical analysis with non-metric multidimensional scaling (NMDS) and permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA). Spectral analysis confirmed that cocultured microalgae had produced different compounds when compared to the axenic ones. Different species yielded similar spectra when interacting with bacteria, evidencing a production of analogous metabolites in response to these interactions. Spectra from cocultured strains with unclear classification indicated and reinforced possible new specie and misleading classification. This novel approach of the MALDI-TOF mass spectra opens new possibilities, and its concordance with the consolidated methods, like molecular data, reinforces the potential of these applications.

Keywords: Microalgae; Bacteria; Ecological Interactions; Species Delimitation; Taxonomy

4.2. Introduction

Plankton is the set of microscopic aquatic organisms that lives in the water column and has limited mobility. It can be divided in bacterioplankton (bacteria), zooplankton (animals), and phytoplankton (cyanobacteria and microalgae). These organisms constantly interact with each other, but the ecological relationships between microalgae and heterotrophic planktonic bacteria are possibly (or 'some of') the most important in aquatic ecosystems (SEYMOUR *et al.*, 2017).

Microalgae are well known for their high reproduction rates. The populational growth of these organisms is mainly controlled by the availability of nutrients in the water, and not by predation (RAMANAN *et al.*, 2015). So, the association with bacteria that promote the remineralization of organic substances is important to the obtention of these inorganic compounds (CHO *et al.*, 2015).

The concept of close interactions between algae/bacteria significantly changed our understanding of element cycling (CIRRI; POHNERT, 2019). Several studies have evidenced that these interactions are tight and highly adaptative (KOUZUMA; WATANABE, 2015; LANDA *et al.*, 2016; MARTIN-PLATERO *et al.*, 2018; TEELING *et al.*, 2016). The main interface where these interactions occur, is the surroundings of the algal cells, which are under the influence of metabolites released by the algae, called "phycosphere" (BELL; MITCHELL, 1972). Thus, these interactions directly interfere in what kind of compounds the algae produce, however, the influence in the intracellular metabolism of the algae is still little known (BOROWITZKA, 2016).

Reliable microalgal identification is not easy. They are very small, morphologically simple, very diverse and have phenotypic plasticity. Besides that, the specific delimitation is hampered by the fact that several groups have only asexual reproduction (GARCIA DA SILVA *et al.*, 2017; KRIENITZ *et al.*, 2011). Therefore, the

biological species concept, one of the most used in species delimitation, may not be suitable for these organisms.

An alternative to overcome this problem is the use of the ecological concept of species (MALAVASI *et al.*, 2016; ŠKALOUD; RINDI, 2013), where the ecological niche delimitates a species (DE QUEIROZ, 2007). This implies in the need of a deeper understanding of the different types of interactions and chemical communications between the microalgae and other organisms, including bacteria.

The modern biological classification tends to use the combination of different approaches to identify a species. This integrative taxonomy uses multidisciplinary data that came from morphology, physiology, molecular biology, chemical composition, phylogeny, ecological interactions, and so on. This is leading to better and more accurate results of species discrimination and diversity studies (DAYRAT, 2005; SCHLICK-STEINER *et al.*, 2010).

To achieve that, we need the efforts of different groups, using and testing different techniques and approaches that can provide these diverse pieces of data allowing an adequate integrative taxonomy.

In this scenario, we tried to examine microalgae biochemical spectra as an approach of their ecological responses when interacting with other microorganisms in laboratory conditions using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). This technique has already showed a high capacity of discrimination of axenic microalgal strains (BARBANO *et al.*, 2015; EMAMI *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2017; MURUGAIYAN *et al.*, 2012). Here, we intend to test if MALDI-TOF MS spectra can provide valuable data for help to elucidate the complicated specie delimitation of this group.

4.3. Material and Methods

4.3.1. Microalgal Strains

We selected 18 strains (**Table 4.1**) that are maintained *in vivo* and in axenic conditions in the Freshwater Microalgae Culture Collection – UFSCar (Portuguese acronym CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853). To avoid unnecessary redundances in the text (including the figures) we will refer to the strains only by the numeric code of each one. This selection comprehends strains of eight different species, belonging to three genera (*Ankistrodesmus*, *Kirchneriella* and *Selenastrum*), all from the same family (Selenastraceae).

4.3.2. Microorganisms Isolation for Microalgal Coculturing

The microorganisms were isolated from two different sources: one from an environmental sample and the other one from a non-axenic culture of *Ankistrodesmus stipitatus* from CCMA-UFSCar (strain 278). Both isolations have been performed with the same steps: **1**) inoculation in Petri dishes with a medium prepared with cell-free culture (dissolved organic matter) of *Ankistrodesmus fusiformis* (strain 333) and agarose 0,8%; **2**) the most isolated colonies were replicated into new Petri dishes using streaking method; **3**) distant and clean colonies were reisolated using streak plate method; **4**) step 3 was repeated three times consecutively and the isolated bacterial strains maintained in liquid medium (organic matter released by *A. fusiformis*). All these manipulations were performed using ultra-violet light bath sterilization of the material and in laminar flow.

From the environmental sample the isolated microorganism was assigned as bacteria 1, and from the laboratory sample the microorganism was assigned as bacteria 2.

Table 4.1. Microalgal strains used in this study are from the Freshwater Microalgae Culture Collection - UFSCar (Portuguese acronym CCMA-UFSCar; World Data Center of Microorganisms 853) and Christina Bock personal collection (CB strains). BR = Brazil; KE = Kenya; FR = France; DE = Germany. Different superscripted letters indicate different locations from same country.

Species	Strain	Origin	Year
<i>Ankistrodesmus arcuatus</i> Korshikov 1953: 296	CCMA-UFSCar 024	BR ^a	1979
	CCMA-UFSCar 003	BR ^a	1979
<i>Ankistrodesmus densus</i> Korshikov 1953: 300	CCMA-UFSCar 239	BR ^b	2010
	CCMA-UFSCar 578	BR ^c	2013
	CCMA-UFSCar 083	BR ^d	2009
<i>Ankistrodesmus fusiformis</i> Corda 1838: 197	CCMA-UFSCar 605	BR ^e	2013
	CCMA-UFSCar 333	BR ^f	2011
	CB 2009/30	KE	2009
<i>Ankistrodesmus</i> sp. Corda, 1838	CCMA-UFSCar 131	BR ^g	1992
	CCMA-UFSCar 277	BR ^h	2011
<i>Ankistrodesmus stipitatus</i> Komárková-Legnerová 1969: 87	CCMA-UFSCar 278	BR ^h	2011
	CCMA-UFSCar 176	BR ^g	1993
<i>Kirchneriella lunaris</i> (Kirchner) Möbius 1894: 331	CCMA-UFSCar 087	BR ^g	1987
	CCMA-UFSCar 123	BR ^g	1992
<i>Kirchneriella obesa</i> (West) West & G.S.West 1894: 16	CCMA-UFSCar 516	BR ⁱ	2012
	CB 2012/37	FR	2012
<i>Selenastrum bibraianum</i> Reinsch 1866: 64	CCMA-UFSCar 047	BR ^j	2008
	CB 2009/36	DE	2009

4.3.3. Experimental Cultures

For each of the 18 microalgae strains we performed three treatments: **1)** axenic condition (treatment A; **2)** cocultured with the bacteria 1 (treatment B1); **3)** cocultured with the bacteria 2 (treatment B2); making up 54 treatments.

All treatments were made in triplicates, using glass tubes (100 × 16 mm) with screw cap with PTFE liner. The initial concentration of microalgal cells was standardized in 3.0×10^4 cells mL⁻¹ (counted in a Muse® Cell Analyzer) with a final volume of 6.0 mL of WC medium (Guillard & Lorenzen, 1972) with pH 7.0 per tube.

In the treatments 2 and 3, 0.1 mL of the bacterial cultures, diluted in WC medium, was added to each replicate. Cultures of both microorganisms, without algae, are made with using 5.9 mL of medium and 0.1 mL of the microorganisms' inoculums.

Experimental cultures were performed using light intensity of $175 \mu\text{mol}_{\text{photons}} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (LED 2700K) in a 12:12h light/dark cycle. Temperature was maintained at $23 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and any handling was performed using the laminar flow to avoid any kind of undesired contamination.

Every two days all cultures were shaken approximately by 5 seconds, in 3000 rpm (IKA® MS3 basic). When necessary, this time was extended to guarantee an adequate homogenization of the cultures. After this, we observed the cultures growth with a spectrophotometer (HACH DR 5000) directly in the glass tubes in 680 and 750 nm (GRIFFITHS *et al.*, 2011). This measurement was made to check the growing of the cultures and verify that they were between the middle of exponential and early stationary growth phases.

4.3.4. Sample Preparation for MALDI-TOF

Each culture was transferred to a sterile 15 mL Falcon-type tube and centrifuged for 15 minutes in a relative centrifugal force (RCF) of $3500 \times g$ (Heraeus Megafuge® 2.0). After the removal of the supernatant, the algal biomass was frozen at $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ and subsequently lyophilized (Heto Drywinner) and re-stored at the same temperature until the spectra obtention.

We performed all data acquisition with the matrix α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA), which was dissolved in solvent mixture of trifluoroacetic acid (TFA) 0,1% and acetonitrile (ACN) in 50:50 v/v ratio, in a concentration of 10 mg mL^{-1} . The algal cells were suspended in this same solvent mixture to a final concentration of 10 mg mL^{-1} . Then, for MALDI-TOF MS analyses, matrix and biomass solutions were mixed at 1:1 (v/v).

The matrix/algae mixtures of each replicate culture were deposited on a MALDI ground steel target plate (MTP 384, Bruker Daltonics®), in triplicate, with a

volume of 2 μL per spot. The plate was left in temperature room to the solvent evaporation.

4.3.5. Spectra Acquisition

We used a MALDI AutoFlex Max (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics®, Bremen, Germany), that was configured and operated with Flex Control 3.4, a software developed by the equipment manufacturer. The spectra mass range varied from 2,000 to 20,000 Da. The calibration was made with the Protein Calibration Standard I (Insulin, $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 5734.51, Ubiquitin I, $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 8565.76, Cytochrome C, $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 12,360.97 and $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ at m/z 6180.99, and Myoglobin, $[\text{M}+\text{H}]^+$ at m/z 16,952.30 and $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ at m/z 8476.65) from Bruker Daltonics®, that followed the same preparation of the algal samples. The equipment general parameters configurations were summarized in the **Table 4.2**.

Table 4.2. MALDI-TOF MS equipment configurations.

Parameter	Value
Bruker Smartbeam™ laser	Positive charge at 2 kHz
PIE (Pulsed Ion Extraction)	450 ns and 8.01 kV lenses
First ion source	19.52 kV
Second ion source	17.76 kV
Time of Flight (TOF)	Linear mode
Laser beam power	70%
Laser attenuations offset	10%

Each spot was shoot until 1,000 spectra was obtained, so for each strain treatment we have obtained a total of 9,000 spectra.

4.3.6. Spectra Treatment

We used the open-source software R (version 4.3.1) to perform the data analysis. Spectra were imported with the package MALDIquantForeign (GIBB, 2019), then checked for atypical spectra with MALDIrppa package (PALAREA-ALBALADEJO *et al.*, 2018) and processed with the package MALDIquant (GIBB; STRIMMER, 2012).

Spectra processing involved the following order: **1)** square root intensity transformation; **2)** Wavelet smoothing with a factor of 2.5; **3)** SNIP (Statistics-sensitive Non-linear Iterative Peak-clipping) baseline removal using 105 iterations; **4)** PQN (Probabilistic Quotient Normalization) normalization of intensities. Afterwards, we calculated the summary spectra of each culture replicate and each strain treatment with MALDIquant using the mean of the obtained spectra.

4.3.7. Data Analysis

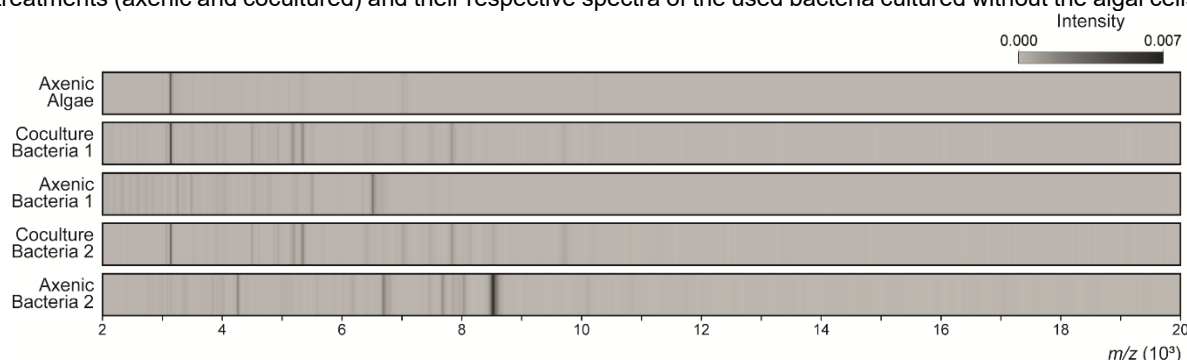
We used Non-Metric Multidimensional Scaling (NMDS) analysis and a permutational multivariate analysis of variance (PERMANOVA), from vegan package (OKSANEN *et al.*, 2013). We have performed iterative tests with all methods of dissimilarity index accepted in the “vegdist” function to choose the method with the best p-value (< 0.05), higher R^2 and lower NMDS stress (< 0.2) (DEXTER; ROLLWAGEN-BOLLENS; BOLLENS, 2018). The heatmap coupled with hierarchical cluster were performed with the package gplots (WARNES *et al.*, 2016) and the used method were determined through the best cophenetic correlation index (SARAÇLI; DOĞAN; DOĞAN, 2013).

4.4. Results and Discussion

4.4.1. Strains Spectra

From the 54 treatments, we could not obtain the spectra of only one: axenic *Kirchneriella lunaris* (123). In a quick visual inspection of the spectra, we identified some differences between the treatments. The illustrative pseudogel visualization of the spectra of one algal strain (**Figure 4.1**), alongside with the spectra of the two isolated bacteria, shows that the peak of m/z of around 3 kDa appears independently of the interaction. On the other hand, one peak slightly above the m/z of 5 kDa seems to be from compounds that are produced by the algae when in interaction.

Figure 4.1. Pseudogel visualization of the spectra of one algal strain (CCMA-UFSCar 239) under the different treatments (axenic and cocultured) and their respective spectra of the used bacteria cultured without the algal cells.



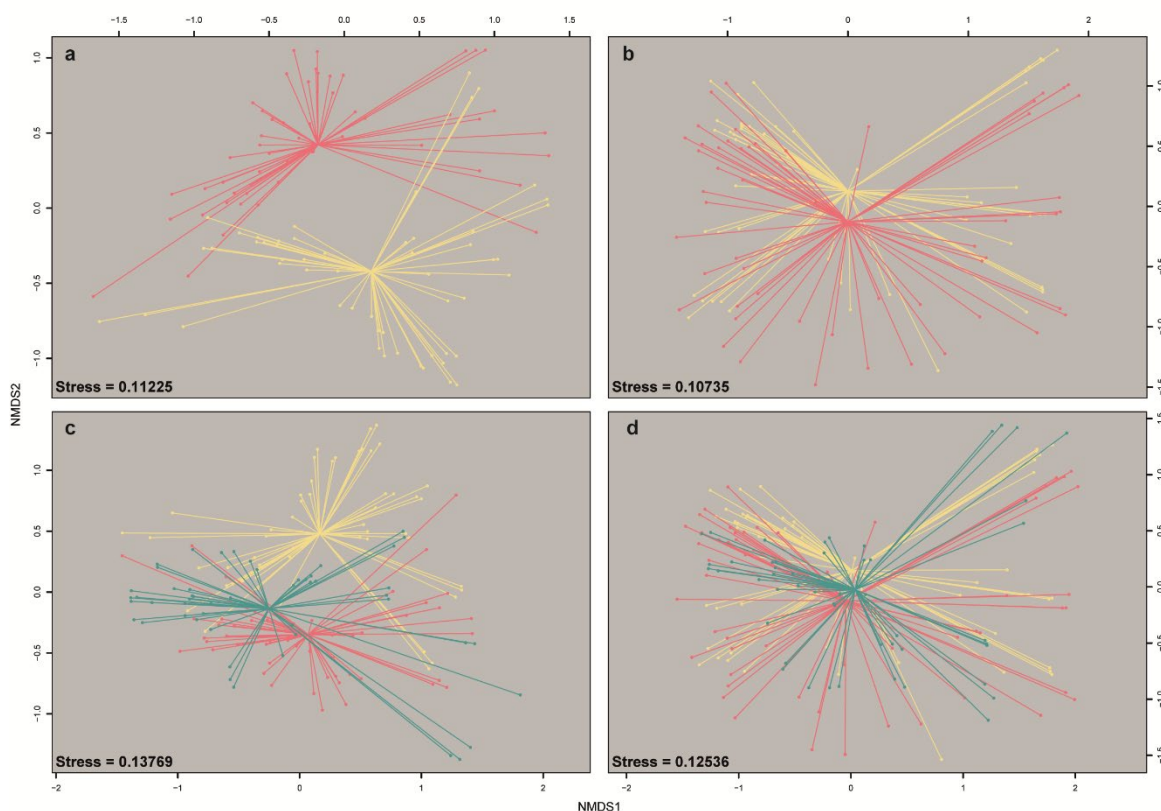
These spectra reveals that the interaction had led microalgae to produce, or increase the production of, intracellular compounds that are not identified in axenic conditions. Differences in the MALDI-TOF spectra of isolated and cocultured bacterial cells have also been reported (AIOSA *et al.*, 2023). These findings reinforce the capability of detecting chemical interactions between microorganisms with the MALDI-TOF MS. The spectra of all cultures with the three different treatments, arranged by strains, can be seen in the supplementary material (**SM 4.1**).

The PERMANOVA iterative tests using the spectral data showed that the Horn distance was the method with the best coefficient values (p-value < 0.05 and stress < 0.2) for grouping the biological replicates by strains, species, and genus in all treatments.

4.4.2. Microalgal Spectra Treatments

The NMDS of whole spectra of the microalgae cocultured with the bacteria 1 and 2 exhibits the formation of two distinct groups (**Figure 4.2.a**), probably determined by the m/z values of certain molecules produced by these two microorganisms. The subtraction of the bacterial spectra from the algal spectra reinforces this hypothesis, once these two treatments (B1 and B2) show great superposition (**Figure 4.2.b**).

Figure 4.2. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plots of MALDI-TOF mass spectra of microalgae cultures in different treatments: axenic strains (green lines), cocultured with bacteria 1 (red lines) and with bacteria 2 (yellow lines). **a)** whole spectra of treatments B1 and B2; **b)** spectra of treatments B1 and B2 with subtraction of the spectra from bacteria 1 and bacteria 2; **c)** whole spectra of treatments B0, B1 and B2; **d)** spectra of treatments B0, B1 and B2 with subtraction of the spectra from bacteria 1 and bacteria 2 from the co-cultured treatments.



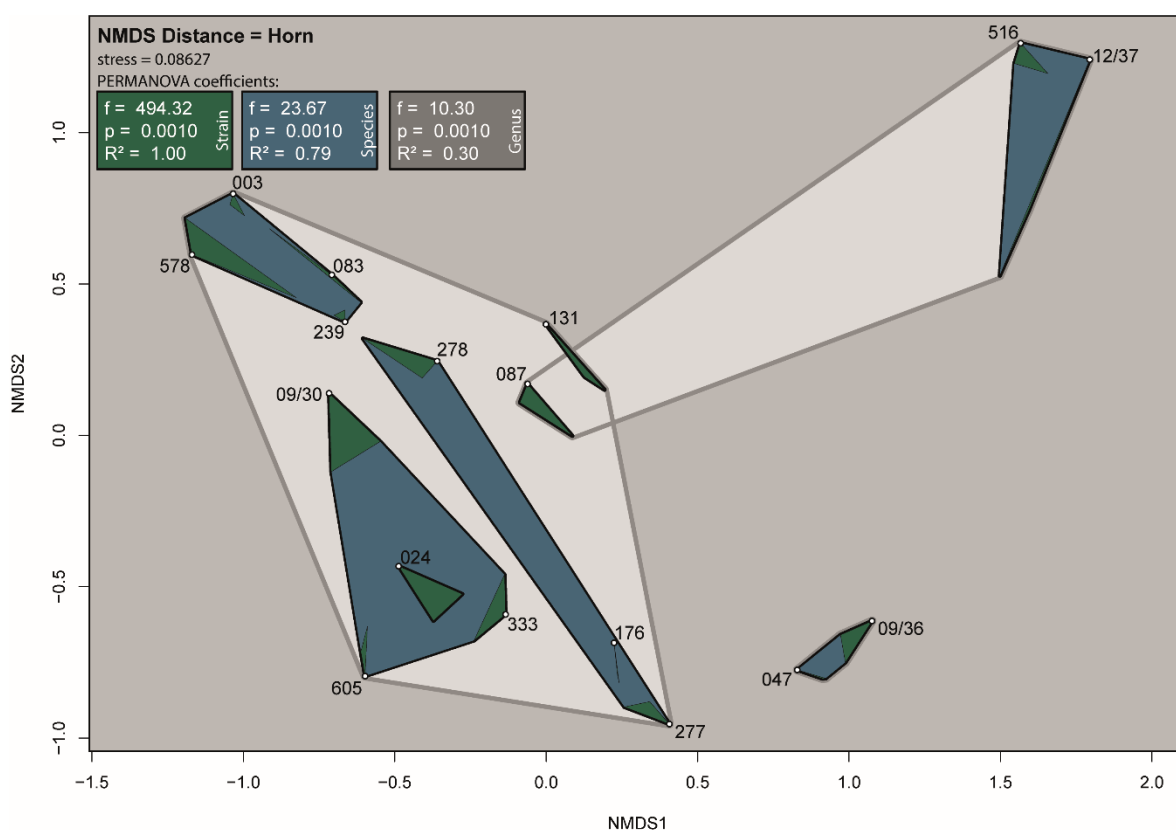
The insertion of the spectra of treatment A in this NMDS analysis showed that without the subtraction of the bacterial spectra, treatments A and B1 present higher similarity between them (**Figure 4.2.c**). However, with the bacterial spectra subtraction, all three treatments overlap each other (**Figure 4.2.d**).

This closest similarity between the spectra of axenic cultures and cocultures with bacteria 1 are possibly because it is a more generalist bacterium (isolated from the environment), and do not have a close relationship with the microalgae. On the other hand, the bacteria 2, isolated from a non-axenic strain kept for years in the culture collection, may have affected more the spectra of the microalgae.

4.4.3. Axenic Strains (Treatment A)

Strain separation explains 99.57% of data variability ($R^2 = 0.9957$; pseudo-F = 494) when using spectra of axenic strains, while grouping data by species explains 79.44% of the variability ($R^2 = 0.7944$; pseudo-F = 24) (**Figure 4.3**).

Figure 4.3. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of axenic strains cultures showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented.



The strains of *Selenastrum bibraianum* (047 and 2009/36) were grouped and did not overlap with any other species. The strains of *Kirchneriella obesa* (516 and 2012/37) are also grouped together, but distant from the other strain (087) of this same genus, which in turn showed a higher proximity with the strains of the genus *Ankistrodesmus*.

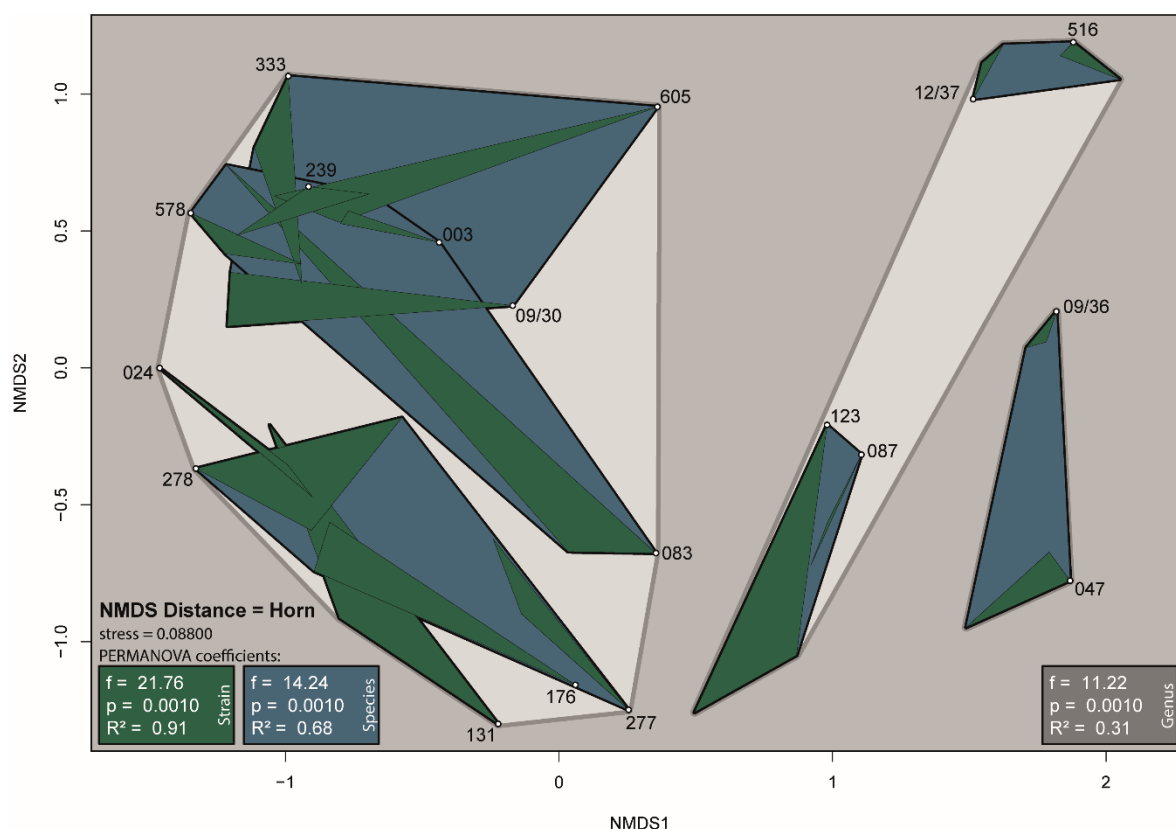
Within the species *Ankistrodesmus stipitatus* (strains 176, 277 and 278) the strains 176 and 277 were more similar regarding MALDI-TOF spectra in accordance with *tufA* phylogeny (**SM 4.2**).

This NMDS also showed that the strain 024 (*Ankistrodesmus arcuatus*) has spectrum with considerable similarity with the strains of *Ankistrodesmus fusiformis* (333, 605 and 2009/30). These close relations between this strain of *A. arcuatus* and *A. fusiformis* are also in concordance with the phylogeny performed with the *tufA* gene (SM 4.2, BAGATINI *et al.*, 2023; BARRETO FILHO *et al.*, 2022; GARCIA *et al.*, 2022).

4.4.4. Microalgae and Bacteria 1 Cocultured (Treatment B1)

Grouping the data by strains explained 91.13% of its variability ($R^2 = 0.9113$; pseudo-F = 22), while grouping by species explained 71.50% ($R^2 = 0.7150$; pseudo-F = 14) (Figure 4.4).

Figure 4.4. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the microalgal strains cultured with bacteria 1 showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented.



The three different genera (*Ankistrodesmus*, *Kirchneriella* and *Selenastrum*) formed distinct groups, without any superposition. The strains of *Selenastrum bibraianum* (047 and 2009/36) exhibited a higher difference among them, when

compared to the axenic spectra. The two species of *Kirchneriella* showed similar pattern that appeared in the axenic spectra.

Differently from the NMDS of treatment A, the strain 024 (*Ankistrodesmus arcuatus*) was placed far from *A. fusiformis*, and closer to the strains of *Ankistrodesmus stipitatus*, especially to 278, in this analysis with only spectra from treatment B1. The interaction with bacteria 1 also resulted in more similar spectra between the strain 131 (*Ankistrodesmus* sp.) and *A. stipitatus*.

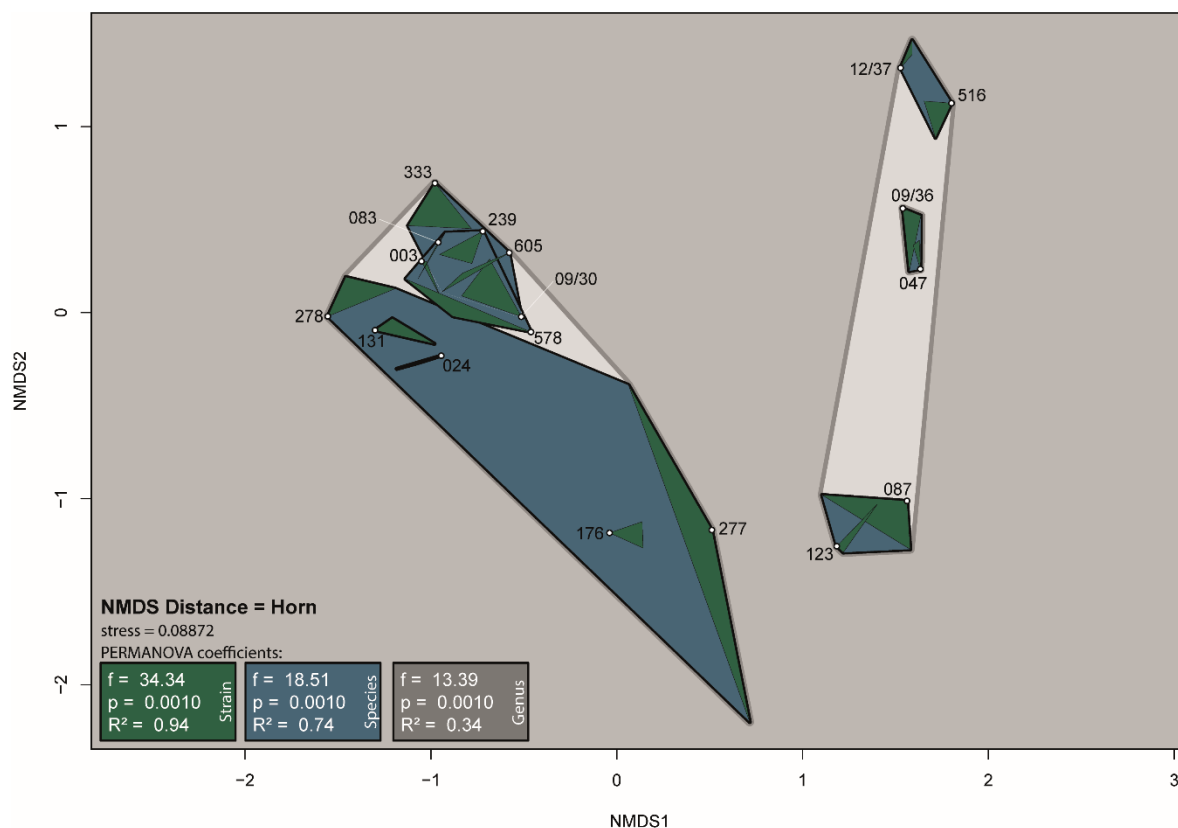
Strains of *Ankistrodesmus densus* (003, 239, 578 and 083) and *Ankistrodesmus fusiformis* (333, 605 and 2009/30) had more similar spectra in this treatment than in axenic one. Possibly this is due to production of similar compounds in response to the presence of other organism in the culture, that are not produced in axenic conditions.

The strain 083 (*Ankistrodesmus densus*) was previously assigned as *Ankistrodesmus flexuosus* by morphological features, however molecular analysis revealed a closer relationship of this strain with the species of *A. densus*. Despite the higher variance in the culture replicates on the treatment B1, our data reinforces this classification of this strain as *A. densus*.

4.4.5. Microalgae and Bacteria 2 Cocultured (Treatment B2)

In the NMDS of treatment B2, grouping data by strains explains 94.19% of its variability ($R^2 = 0.9419$; pseudo-F = 34), while grouping by species explains 73.82% ($R^2 = 0.7382$; pseudo-F = 18) (**Figure 4.5**).

Figure 4.5. Non-metric multidimensional scaling (NMDS) plot of the microalgal strains cultured with bacteria 2 showing the similarity of MALDI-TOF MS spectra among strains (green polygons) and species (blue polygons). The PERMANOVA coefficients are also presented.



The strains of the genera *Selenastrum* and *Kirchneriella* formed very cohesive groups of species but presented superposition when grouped by genus.

For the genus *Ankistrodesmus*, the strains 176 and 277 are the ones that showed the more distinct response to the interaction with the bacteria 2. Once again, the strain 278, that belong to the same species (*Ankistrodesmus stipitatus*), showed higher similarity with the other species of this genus. Worth it to mention that the strains 277 and 278 were isolated from the same place in the same date. These divergent responses can be the result of asexual reproduction leading to distinct lineages. This does not mean that it is a different species, but may be in process of speciation, thus leading to gradient of speciation.

The strains of *Ankistrodesmus densus* e *Ankistrodesmus fusiformis* were close once again, corroborating the idea that these strains have similar responses to this type of interaction, although they are they are more distant phylogenetically.

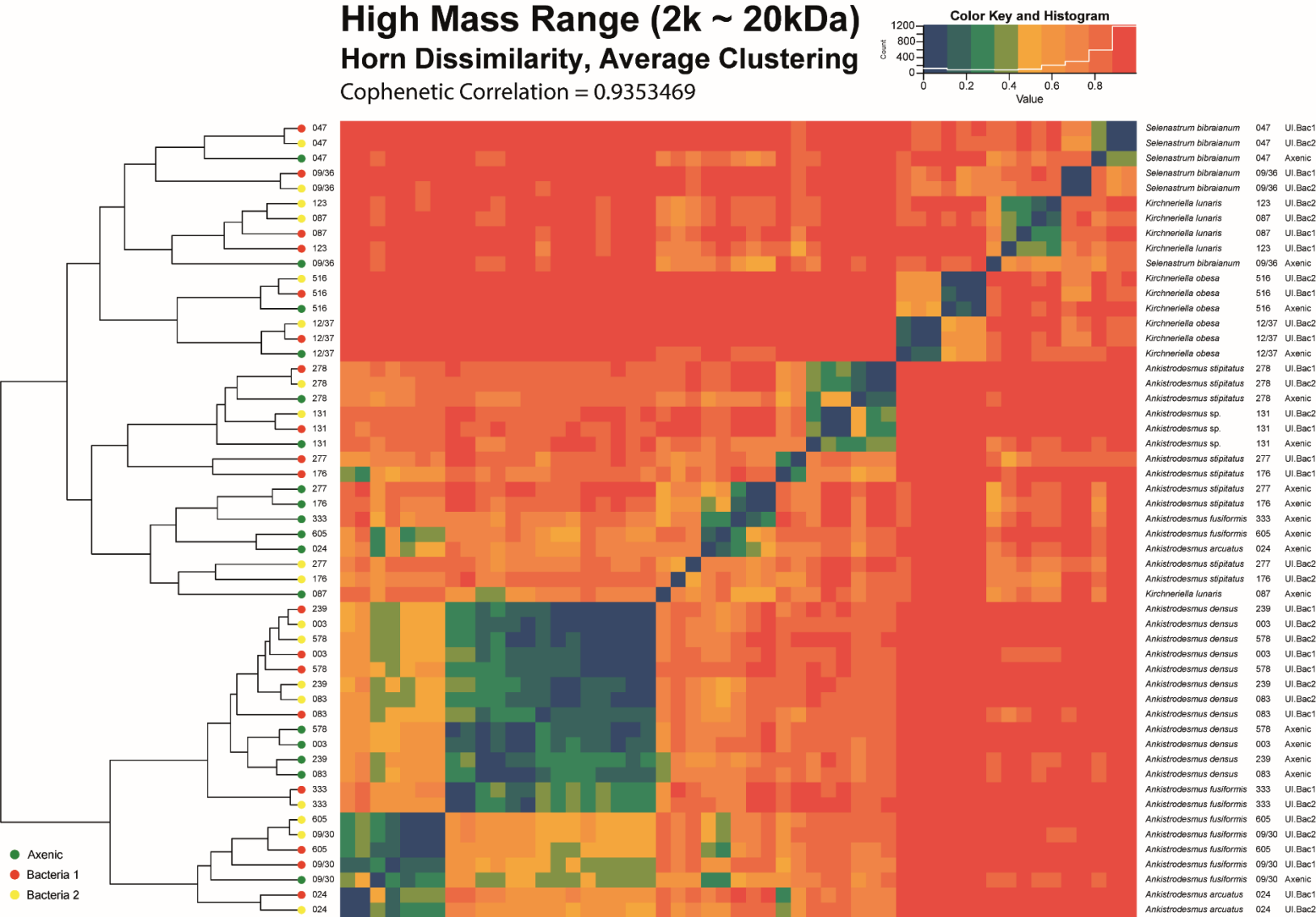
The analysis of NMDS highlighting the three treatments (**Figure 4.2**) and the NMDS detailing the microalgal groupings (**Figure 4.3 to Figure 4.5**) evidenced that the interactions between these microorganisms affects the production of intracellular molecules, and being different depending on the bacteria that is interacting.

4.4.6. Spectra Heatmap and Clustering

The clustering analysis (**Figure 4.6**) showed that the strains 047 (*Selenastrum bibraianum*), 516 (*Kirchneriella obesa*), 2012/37 (*Kirchneriella obesa*), and 278 (*Ankistrodesmus stipitatus*) were always in the same clade, independent of the treatment. The strain 131 (*Ankistrodesmus* sp.) showed similar clustering results, but with a slightly higher difference of the axenic culture when compared with the cocultured ones. In all these five cases, the cocultured treatments (B1 and B2) presented higher similarity between them regarding the axenic cultures.

On the other hand, the strains 176 and 277 (*Ankistrodesmus stipitatus*) formed clades between these two strains by different treatments. The axenic cultures of these strains formed a single clade with the also axenic cultures of the strains 333 (*Ankistrodesmus fusiformis*), 605 (*Ankistrodesmus fusiformis*), and 024 (*Ankistrodesmus arcuatus*). The cocultured treatments of these last two strains were grouped in another clade, that included all the treatments of the other strain of *Ankistrodesmus fusiformis* (2009/30). The cocultured strains of the 333 formed a separated clade that was closer to the other species of same genus.

1 **Figure 4.6.** Heatmap of the Horn Dissimilarity Matrix between the mean spectra of each treatment (axenic and cocultures) of the microalgal strains. The coupled dendrogram is
2 clustered with the average algorithm.



The strains of *Ankistrodesmus densus* (003, 083, 239, and 578) formed a distinct and concise clade, with a clear separation of the axenic cultures from the cocultured ones. This grouping, once again, reinforces that the strain 083 is an *A. densus*, even with the discrepancies presented in the treatment B1.

Although the heatmap seems to present higher similarities between the strains of the genus *Ankistrodesmus* than to the other two genera, the cluster analysis did not form a single clade of this genus. The overall proximity of the genera *Selenastrum* and *Kirchneriella* appears to be higher both in the heatmap and in the clustering analysis, corroborating the phylogenetic data (SM 4.2).

The samples of the species *Kirchneriella obesa* formed a concise clade, except for the axenic strain of *Kirchneriella lunaris* (087). Nonetheless, in the cocultures with bacteria, the strains 087 and 123, were grouped together. The absence of the axenic sample of the strain 123 maybe had influenced this result.

4.4.7. Microorganisms Interactions

Studies with MALDI-TOF mass spectra of cocultured microorganisms are certainly scarce, especially for microalgae. Lee *et al.* (2008) performed a MALDI-TOF MS analysis of two different cocultures of dinoflagellates and successfully identified peaks in the spectra that can confirm the presence of more than one species, and Barbano *et al.* (2015) obtained spectra of two simple microalgae mixtures, with two and three cultures, which yielded spectra that afforded to differentiate individual samples from mixed ones.

Even with bacteria, that had been way more scrutinized in MALDI-TOF MS, studies with mixtures and interactions are limited. Similarity coefficient-based and biomarker-based identification with samples of mixed bacteria were capable of correctly identify them when containing two isolates. However, the identification of

mixtures with more than that could only be performed with biomarker-based strategy (ZHANG; SMART; SANDRIN, 2015). Yang et al. (2018) developed a framework for identifying strains in bacterial mixtures and cocultures and found a higher reliable species identification with binary and ternary mixtures. Another study, with bacterial cocultures analyzed by MALDI-TOF MS, found that this technique can detect the inhibition and/or induction of the production of different compounds (AIOsa *et al.*, 2023).

Although there is a lack of data for these microbial interactions with MALDI-TOF MS the capacity of detecting differences in isolated and mixed samples is certain, notably when there is a reference spectra database. The concordance of our data from the cocultures (treatments B1 and B2) and from the axenic cultures (treatment A) with molecular data, that is a well-established and consolidated method for taxonomy and phylogeny, indicates a reliable method for species discrimination. Furthermore, the data from the cocultured samples can be valuable for helping in species delimitation of the microalgae, like the example of the strains 024 and 131. Our findings reinforces that the strain 024 is *A. fusiformis* instead of *A. arcuatus*, and the strain 131 is possibly a new species, still undescribed, from the genus *Ankistrodesmus*. This is possible because the usage of the ecological concept and in an integrative approach they indicate intraspecific differences and highlight important functional differences between different species.

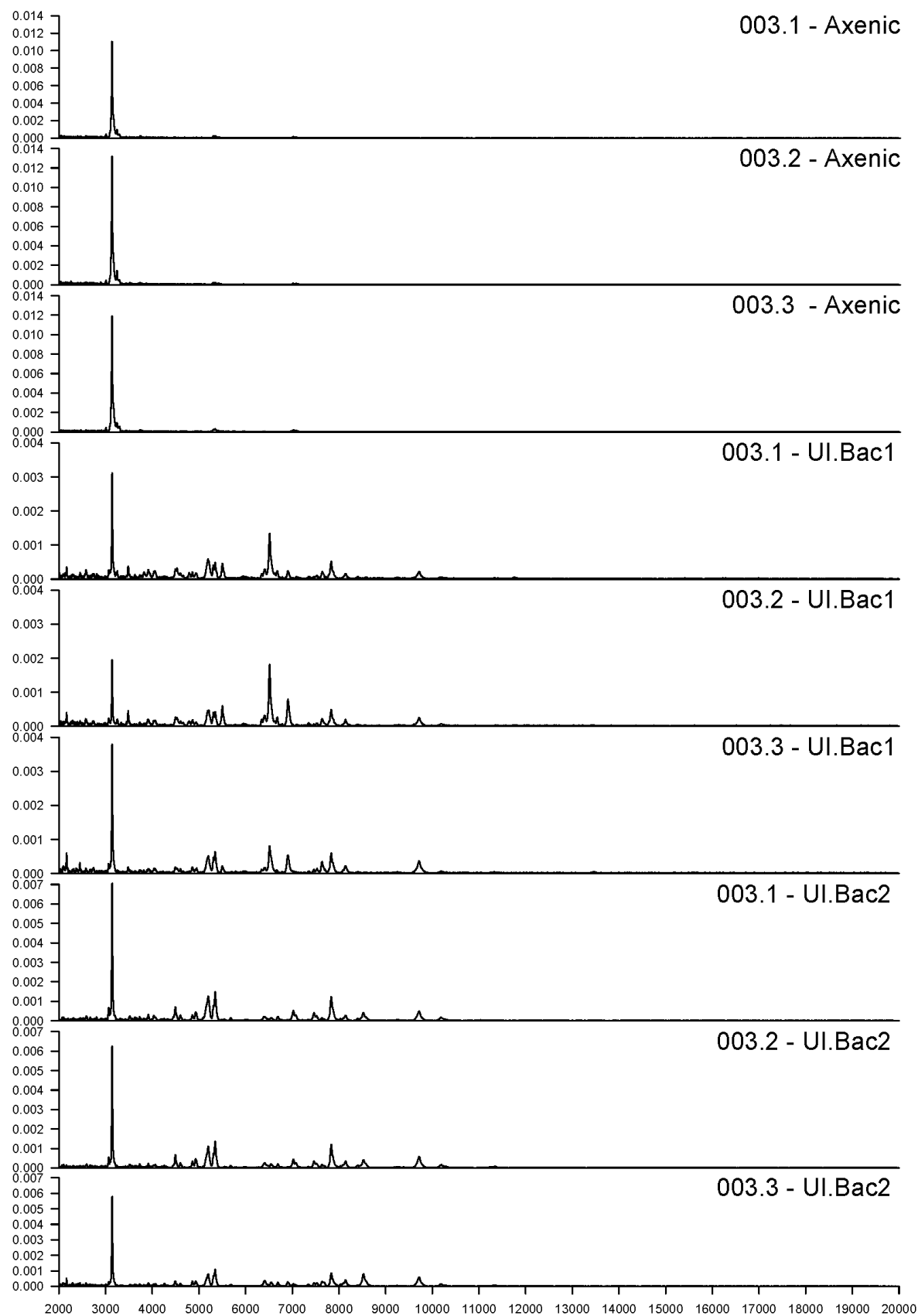
4.5. Conclusions

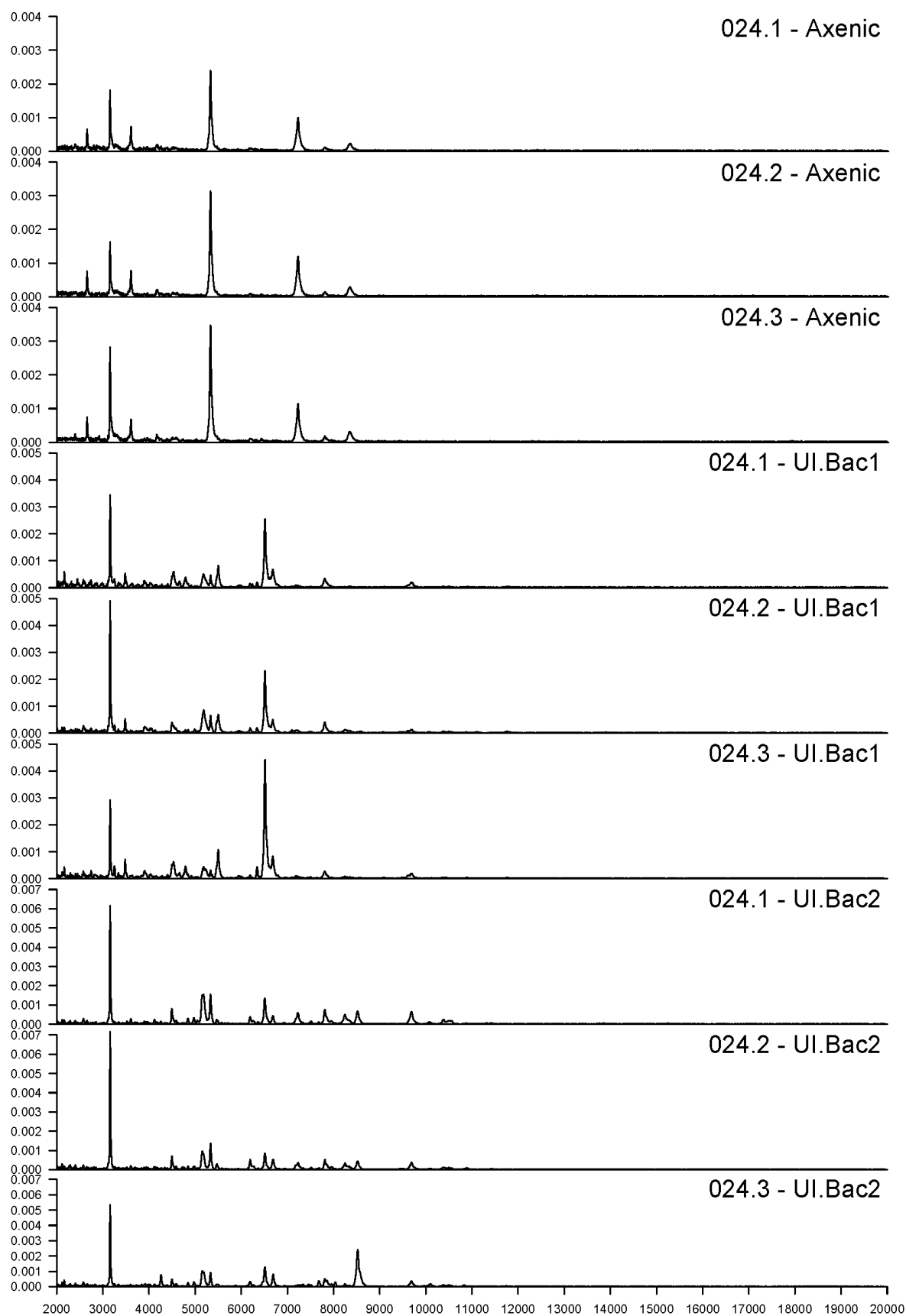
The present study analyzed MALDI-TOF mass spectra of microalgal cells that were cocultured with bacteria. That is a novel approach to study microalgae-bacteria interactions and ecological species delimitation in microalgae. This technique can certainly differentiate axenic and cocultured microalgal strains and seems to have a

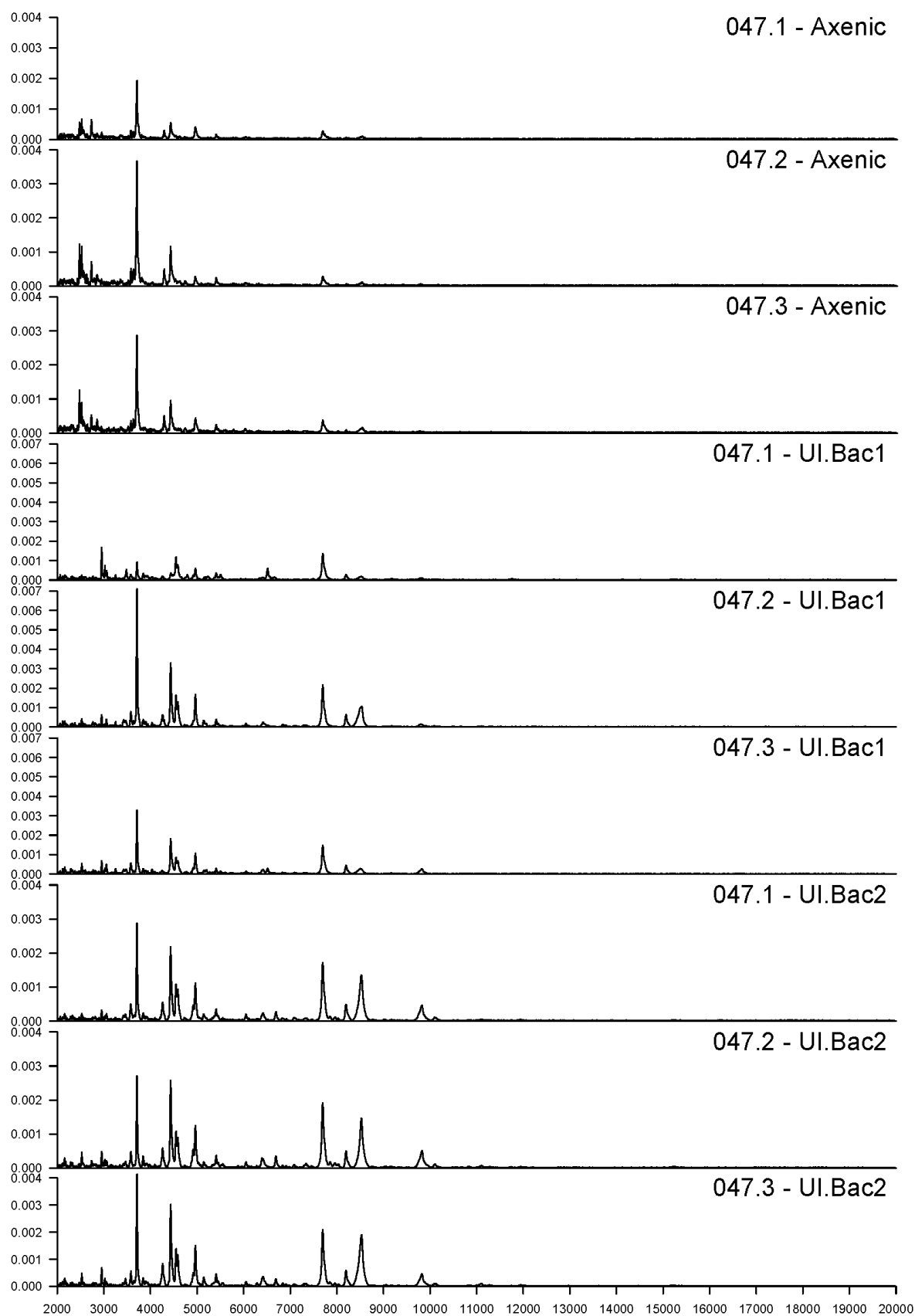
better species identification with axenic strains. However, cocultures helps understanding intra and interspecific differences considering ecological responses of microalgae. The strains of *A. densus* and *A. fusiformis*, despite higher phylogenetic distance, showed more similar spectra when cocultured with bacteria, indicating that they present similar metabolic responses to the interactions with the bacteria. The spectra of the strains 131 and 024 indicates the possibilities of being a new species and a misleading classification, respectively. New experiments and the enhancement of microalgal spectra databases can provide valuable data on these aspects to the phylogenetic relations and species delimitation of the group with the integrative taxonomy.

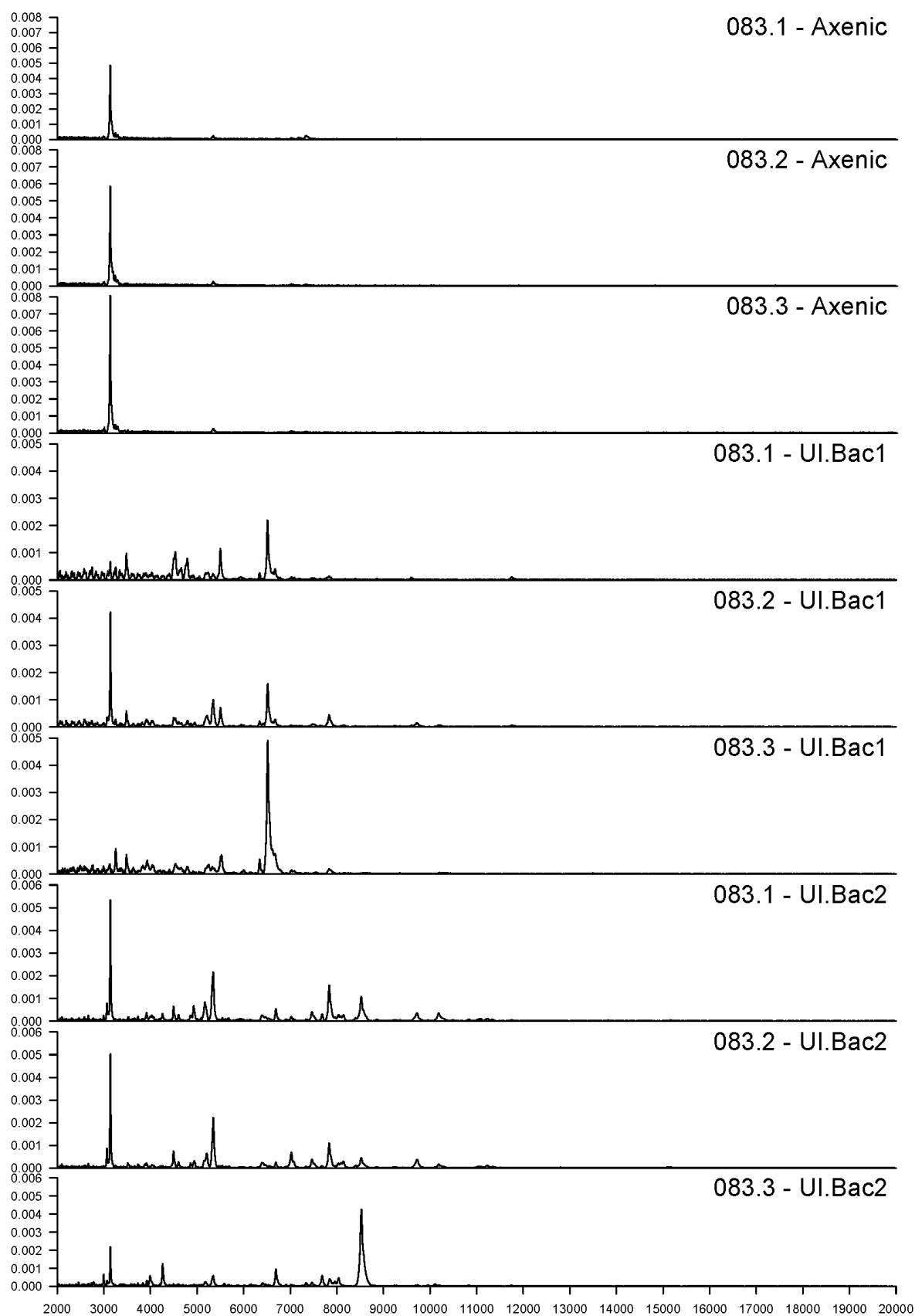
4.6. Acknowledgements

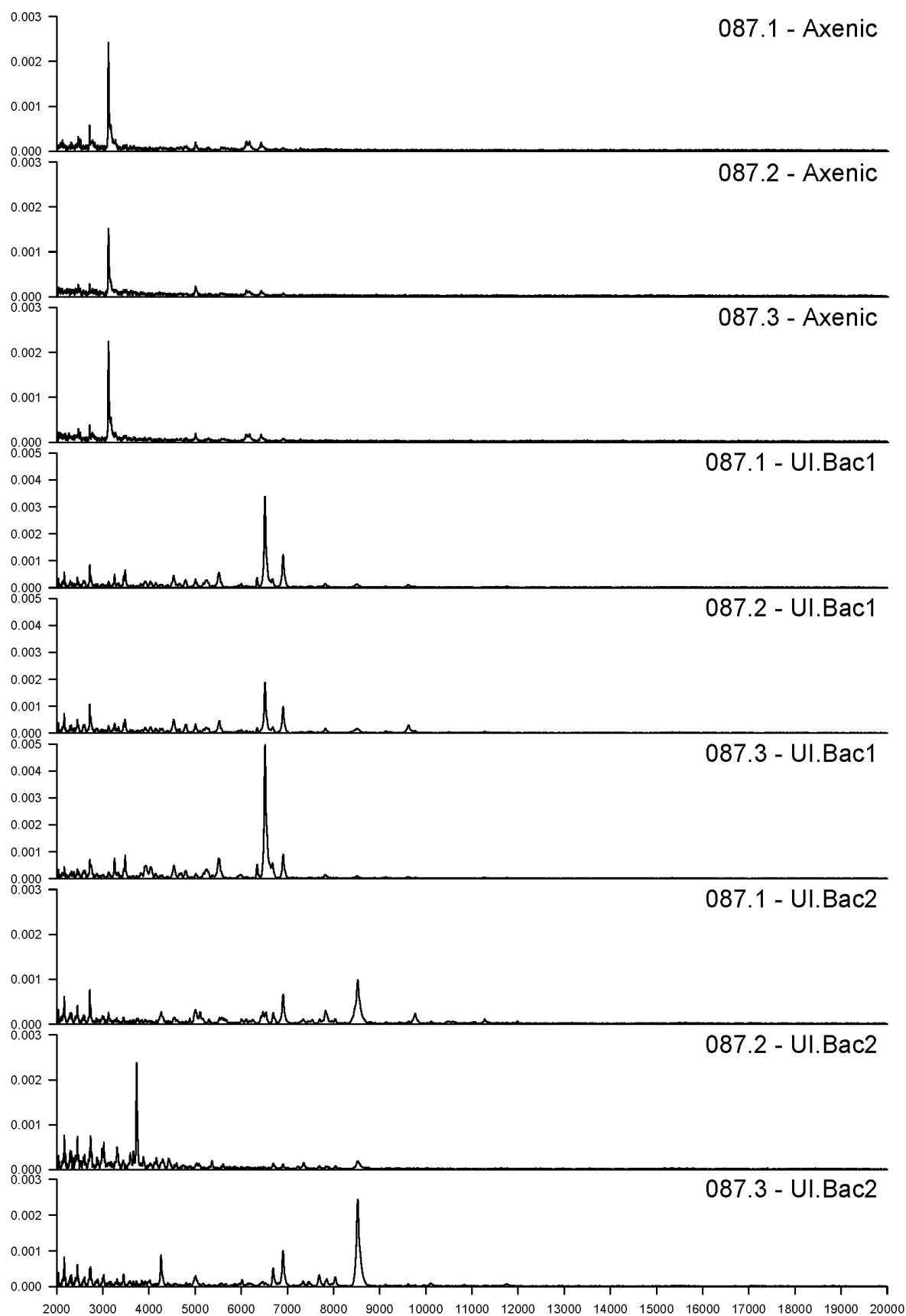
The authors gratefully acknowledge the funding agencies CNPq to the grant to RVM (141131/2017-9) and to ILB (427777-2018/6). We are also grateful to Prof. Daniel Rodrigues Cardoso for the usage of MALDI AutoFlex Max (TOF/TOF) MS (Bruker Daltonics®) supported by FAPESP (17/01189-0), to Dr. Sinara Teixeira do Brasil Morais for the spectra acquisition and blind test collaboration, and to Prof. Ana Teresa Lombardi for the use of cell counter.

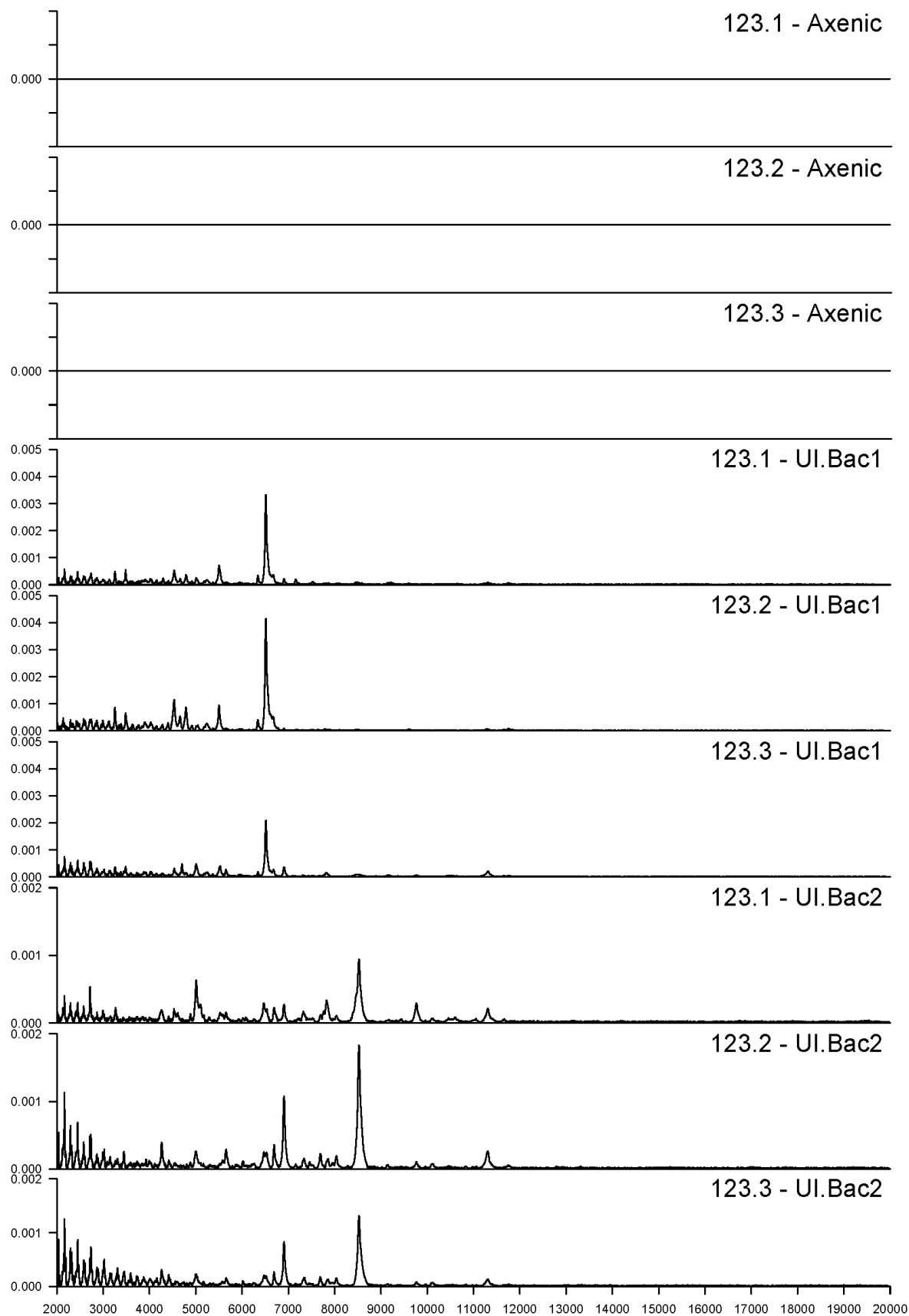
71 **4.7. Supplementary Materials**72 **SM 4.1.** MALDI-TOF mass spectra of select strains for axenic and cocultured treatments (continue).

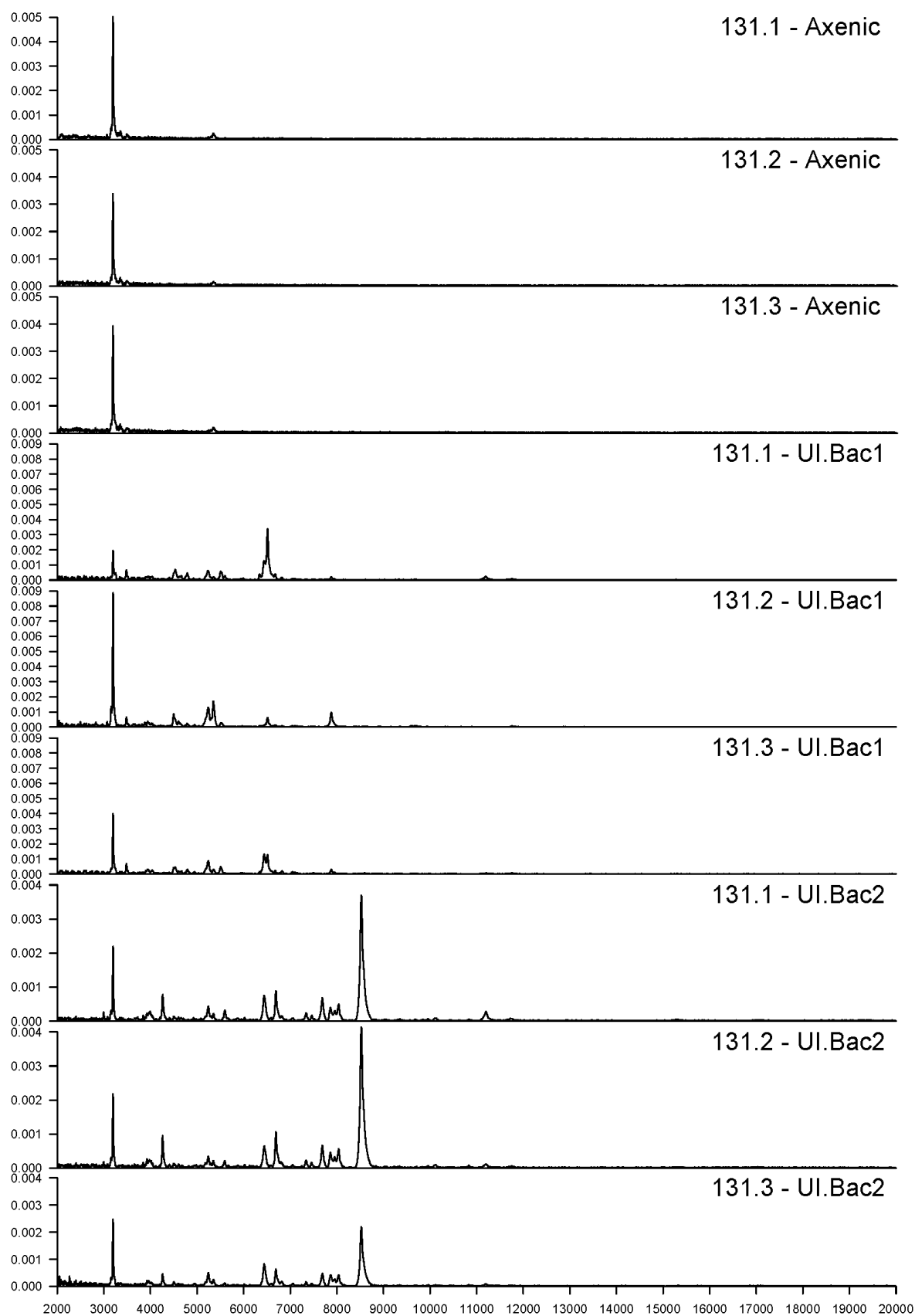


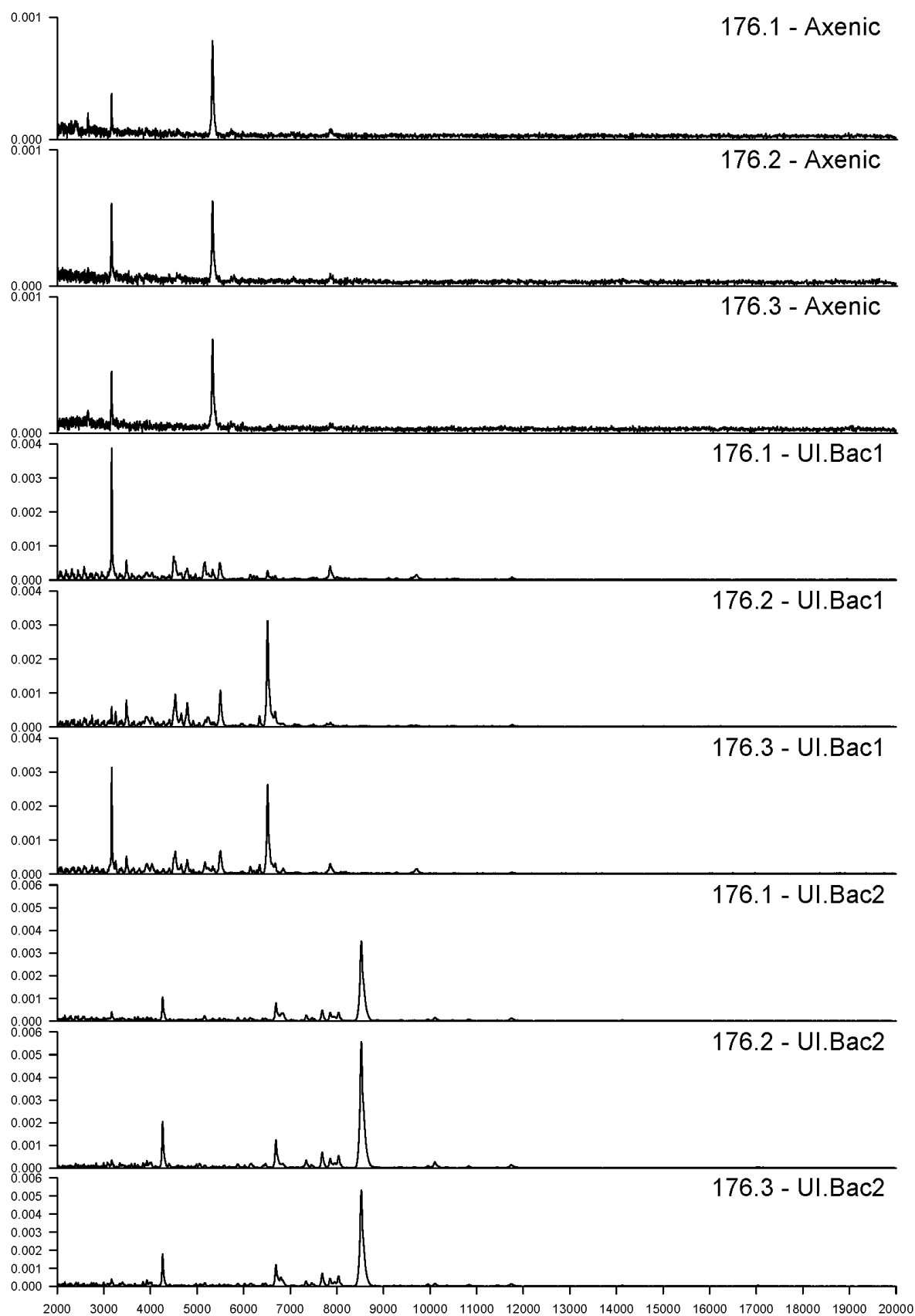


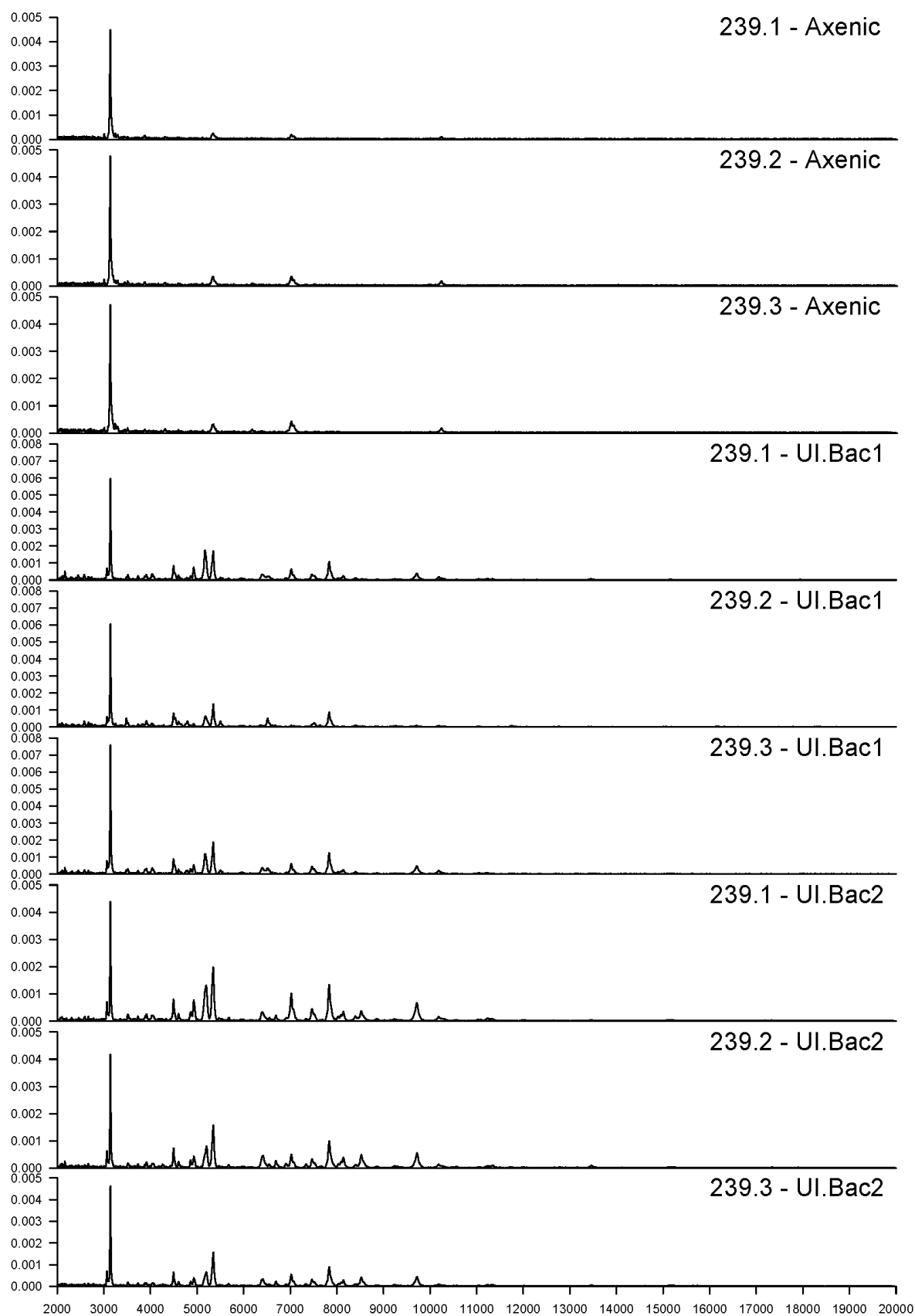


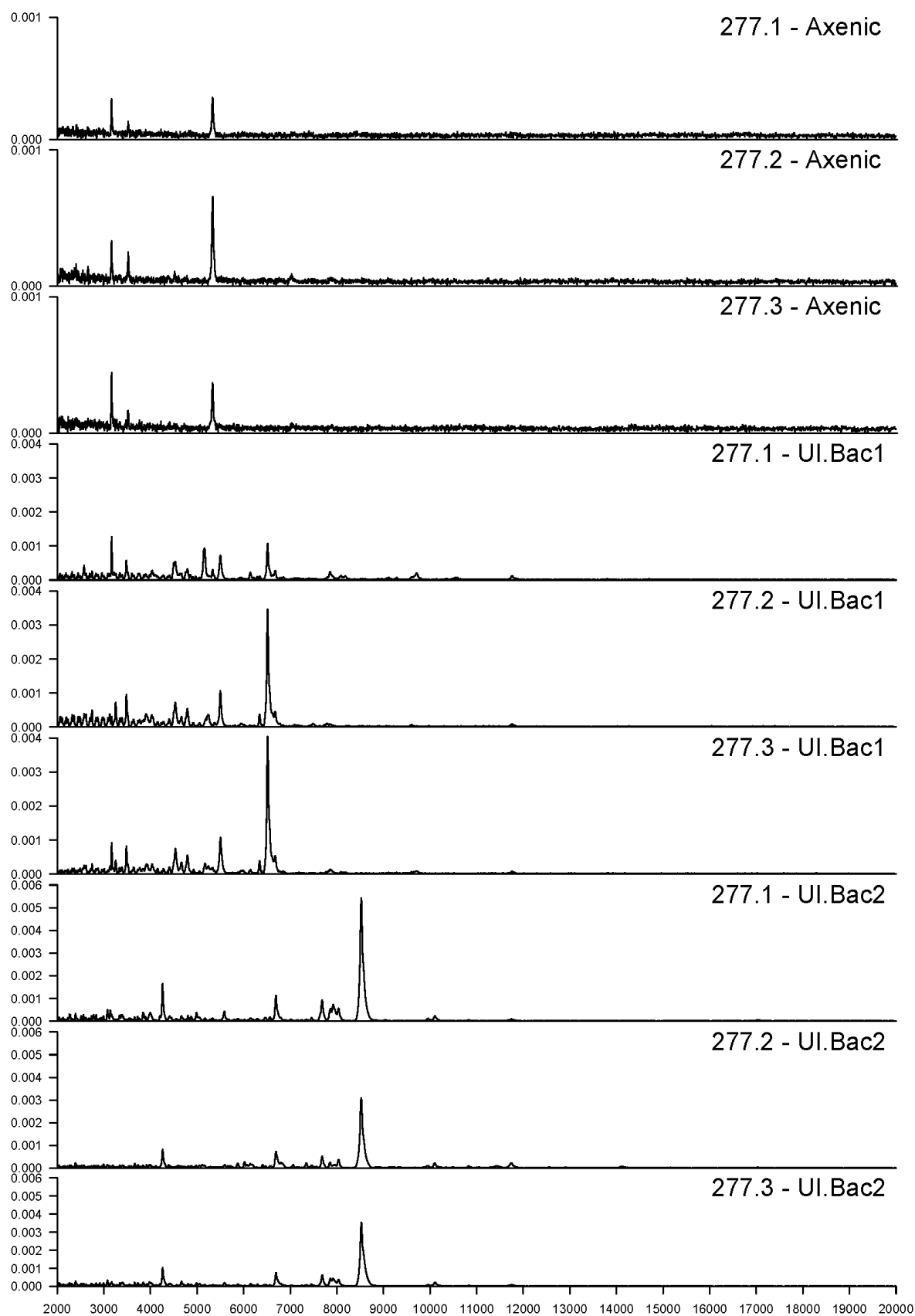


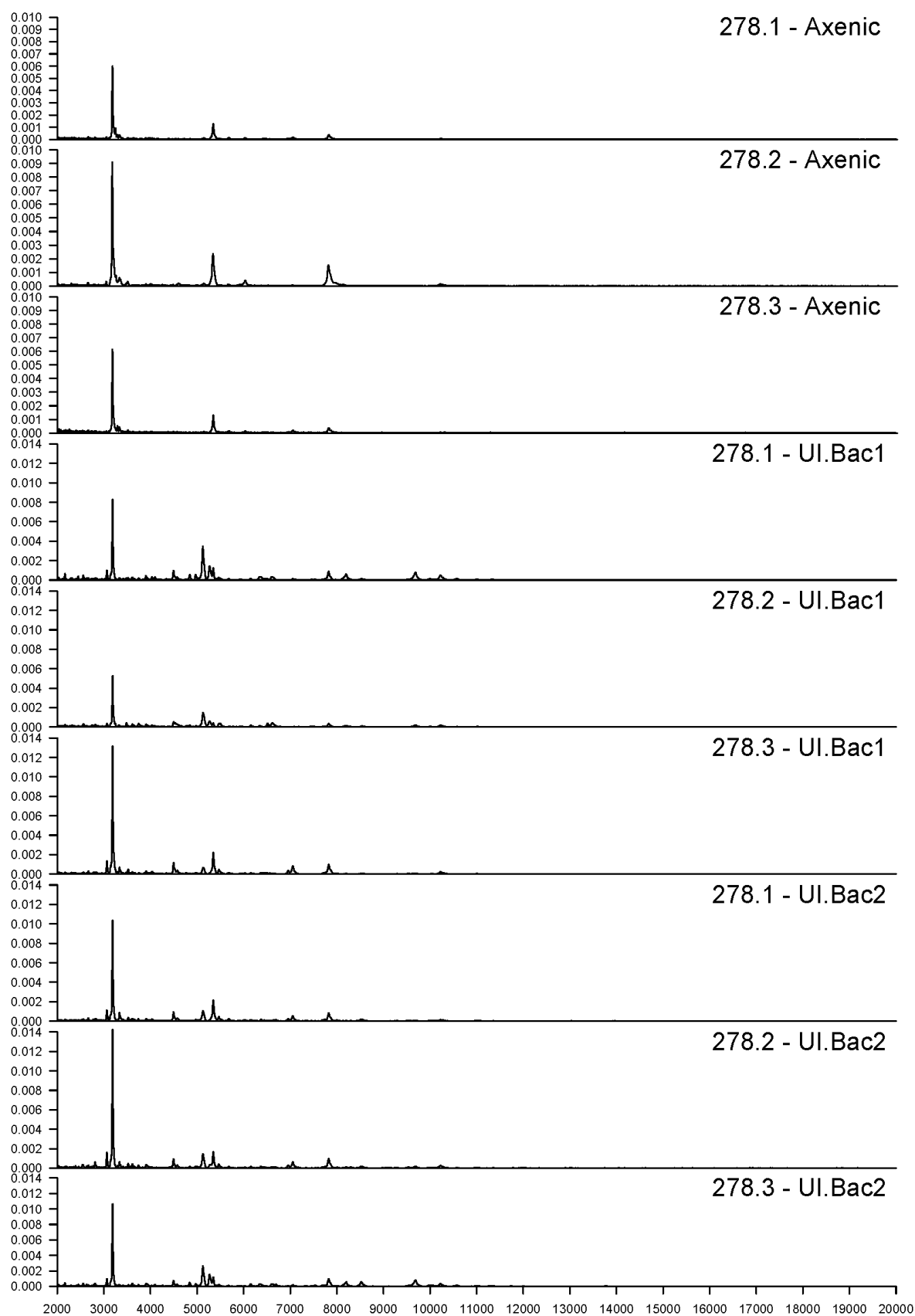


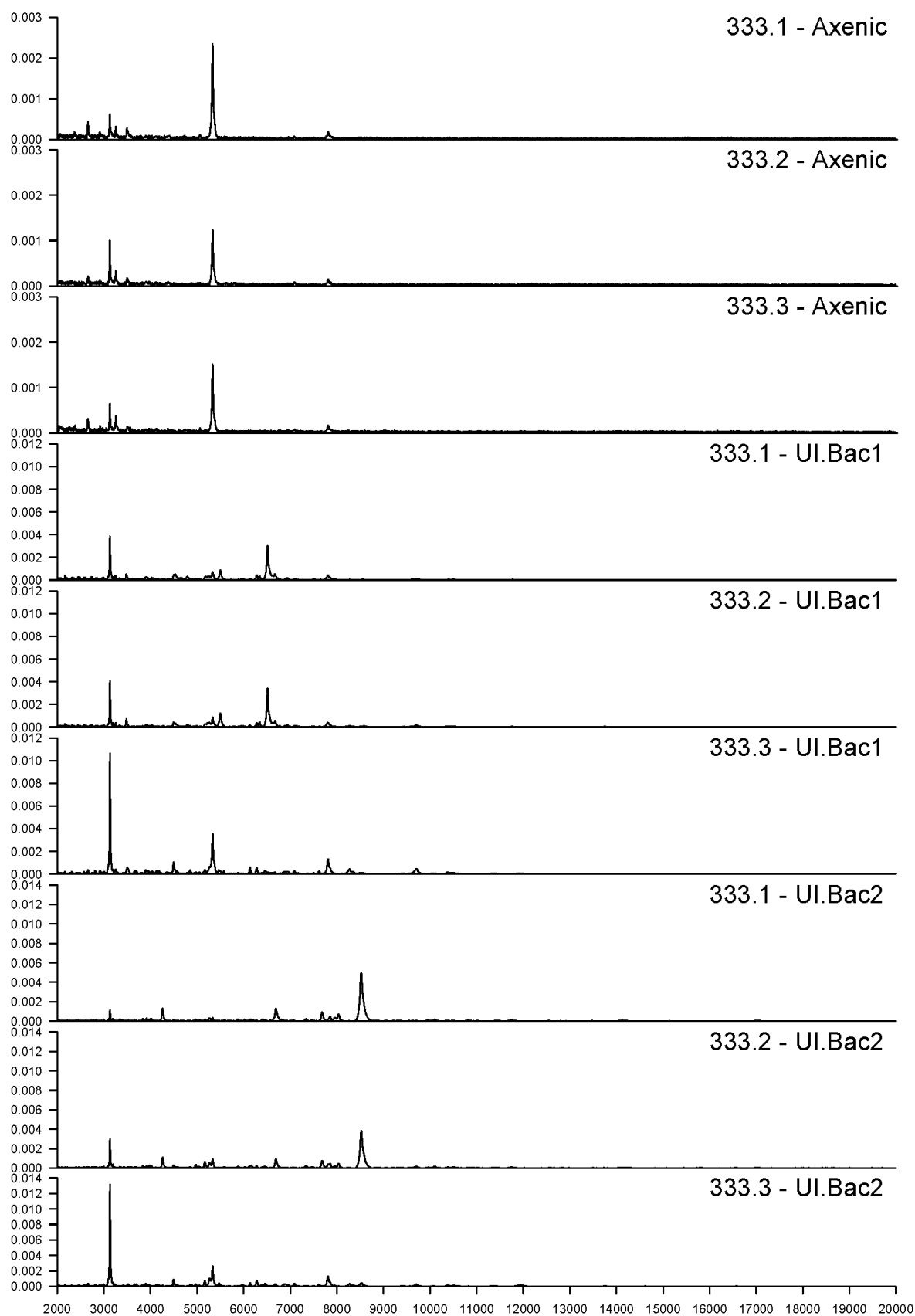


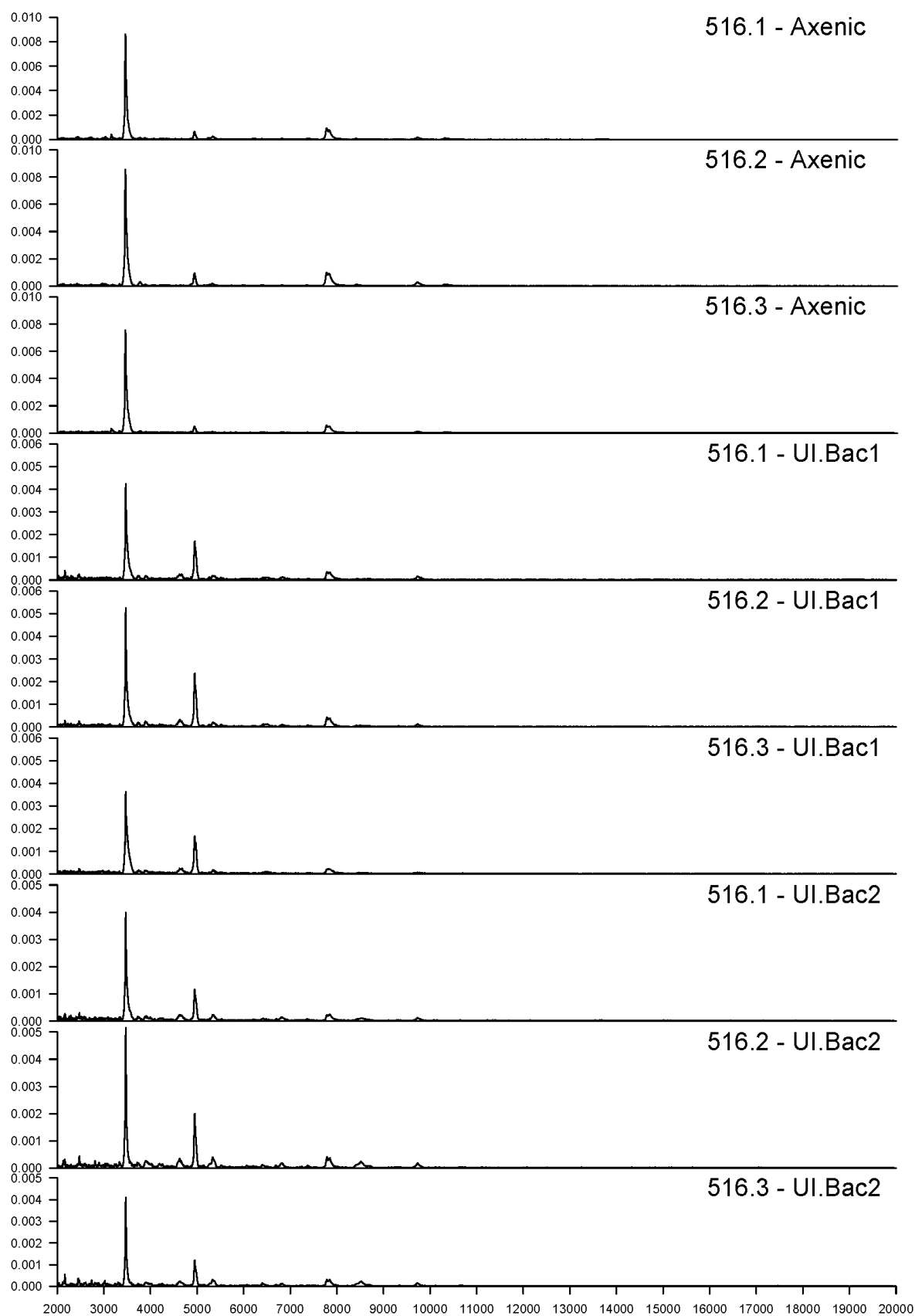


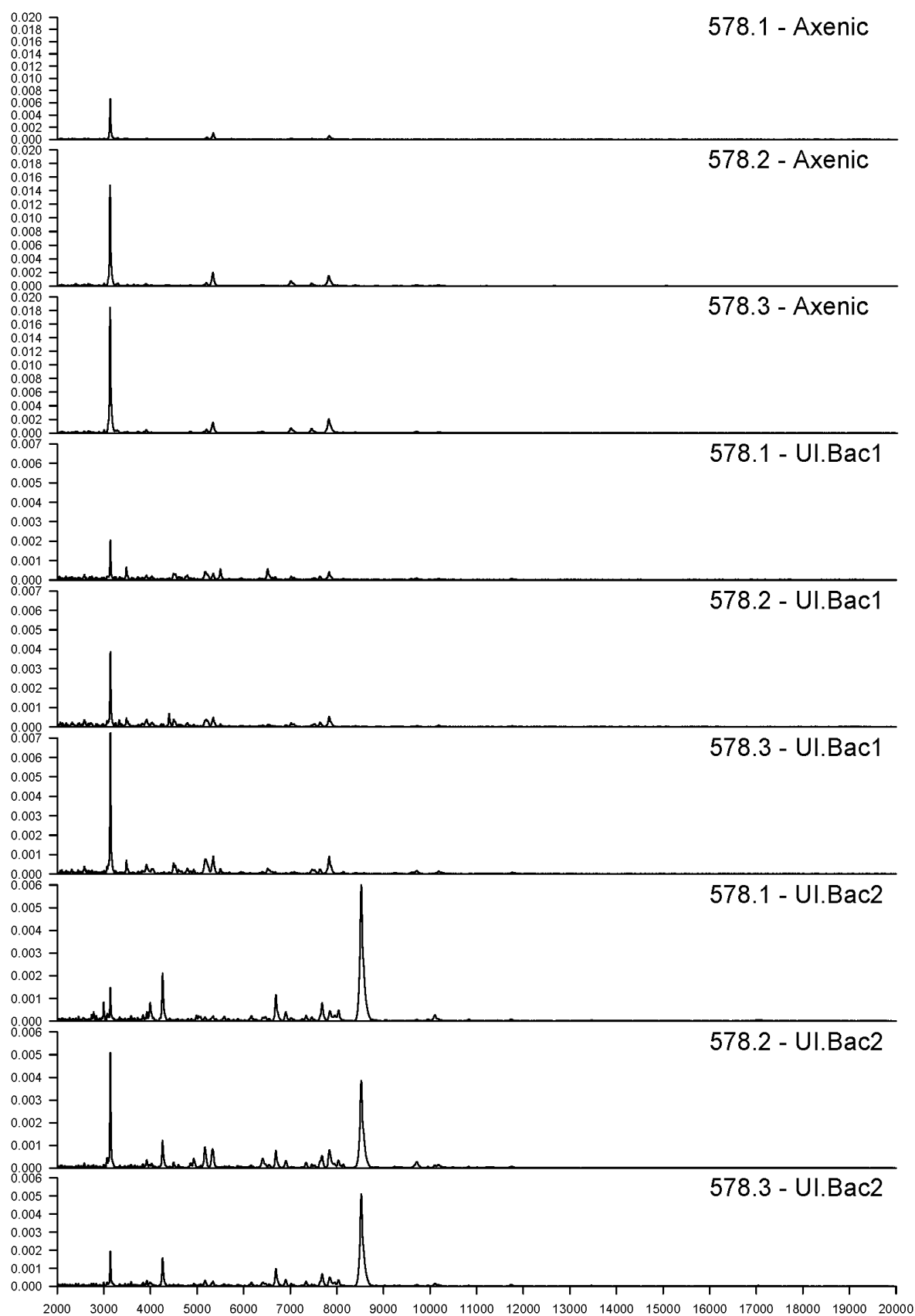


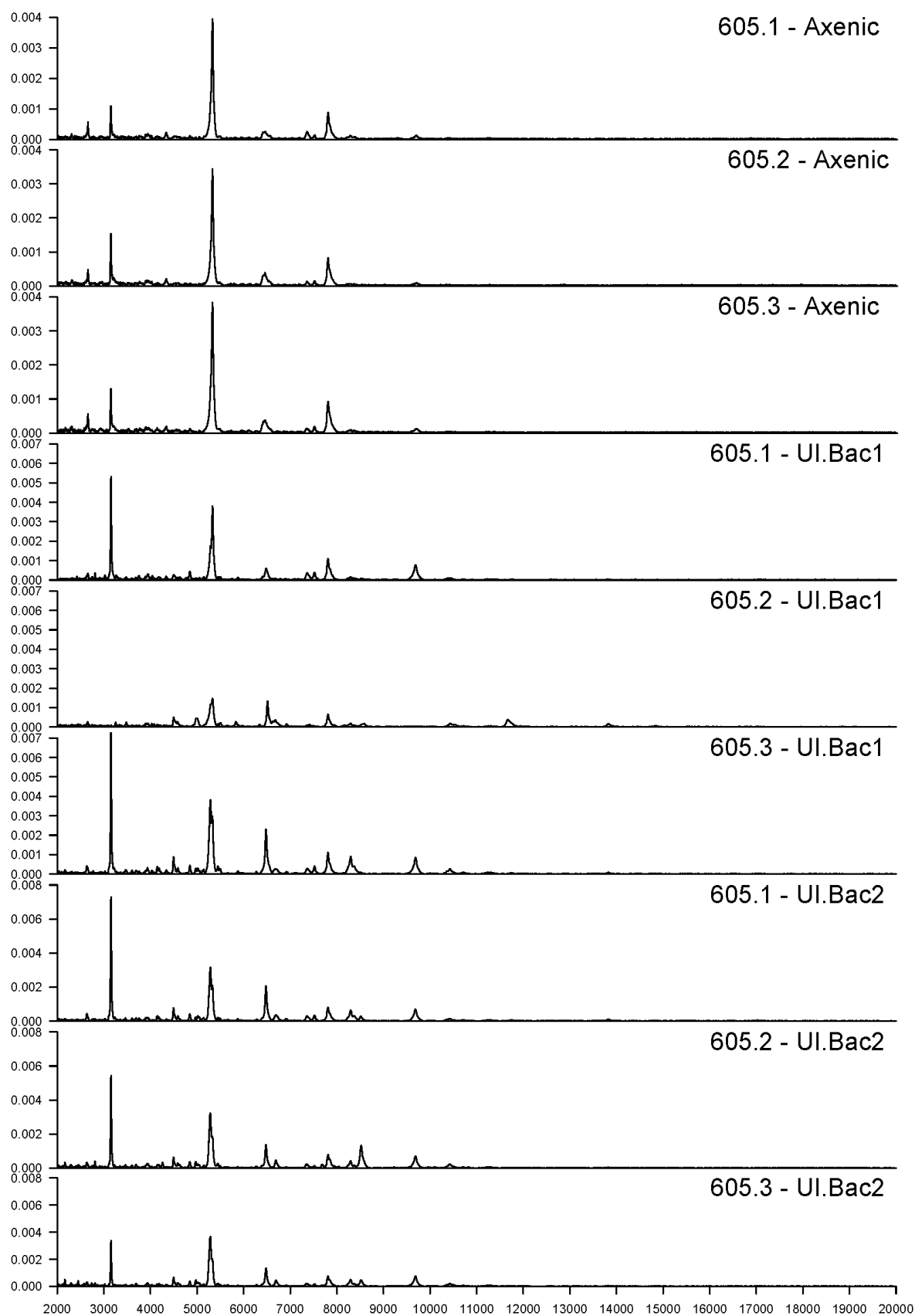


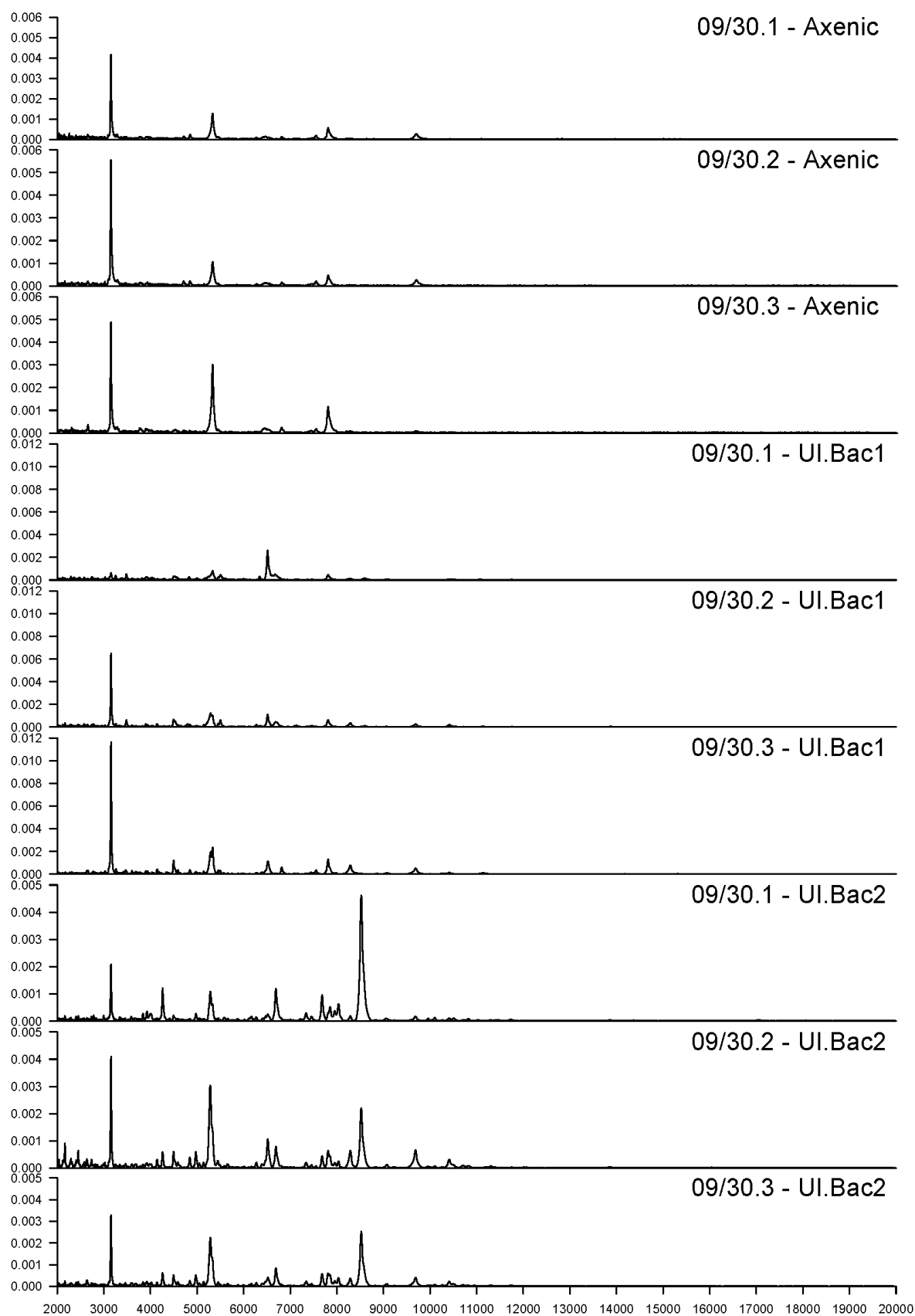


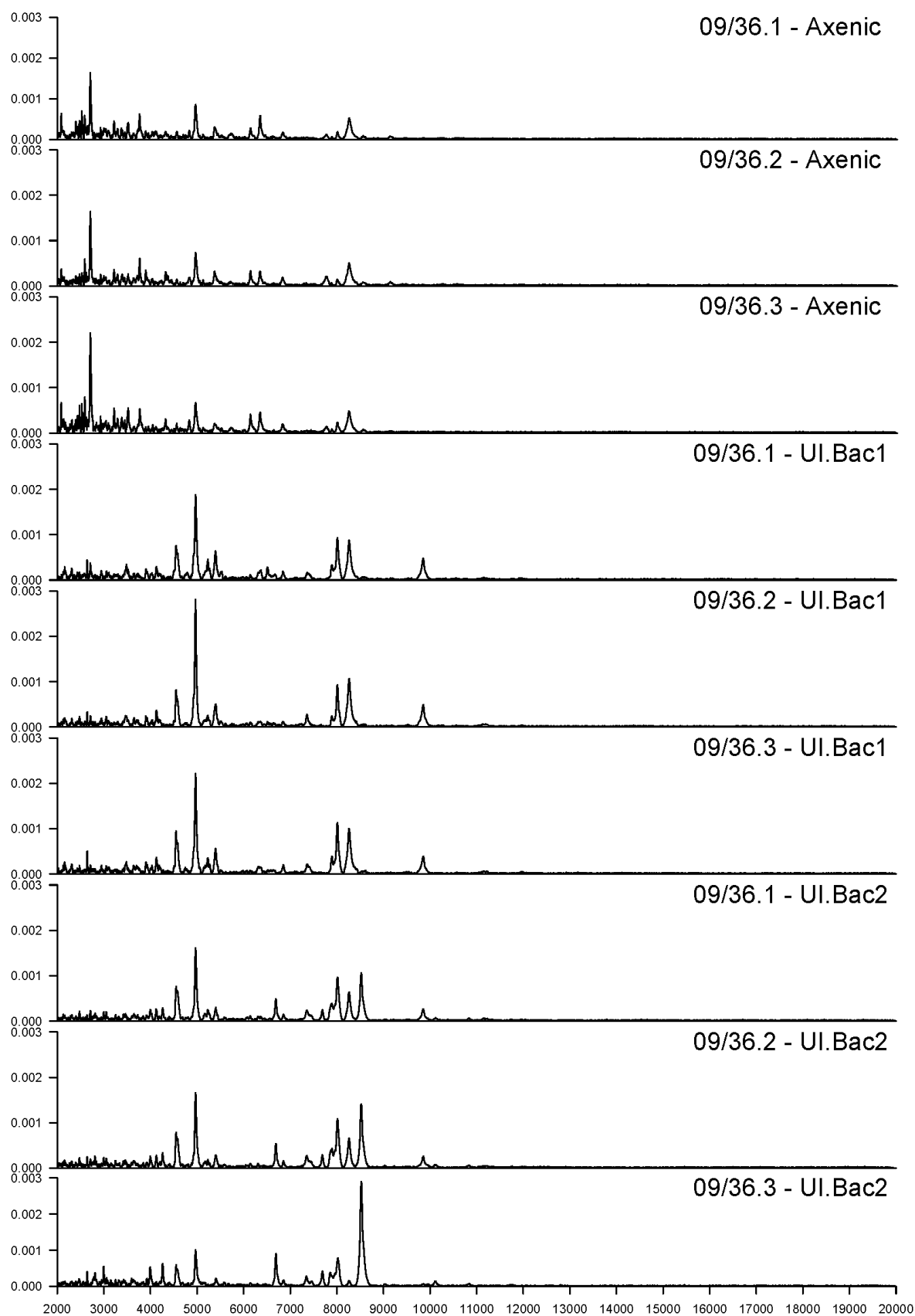


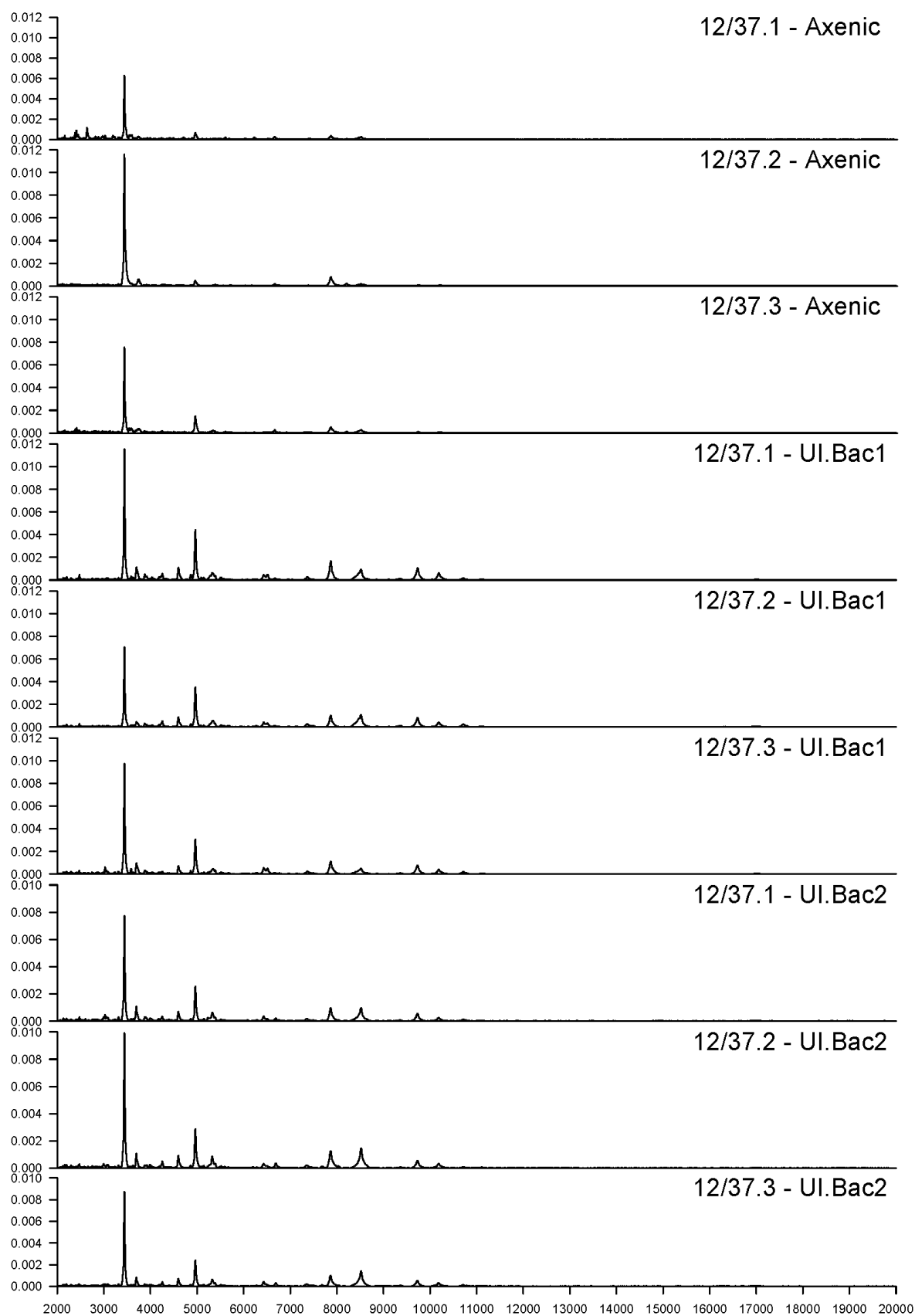










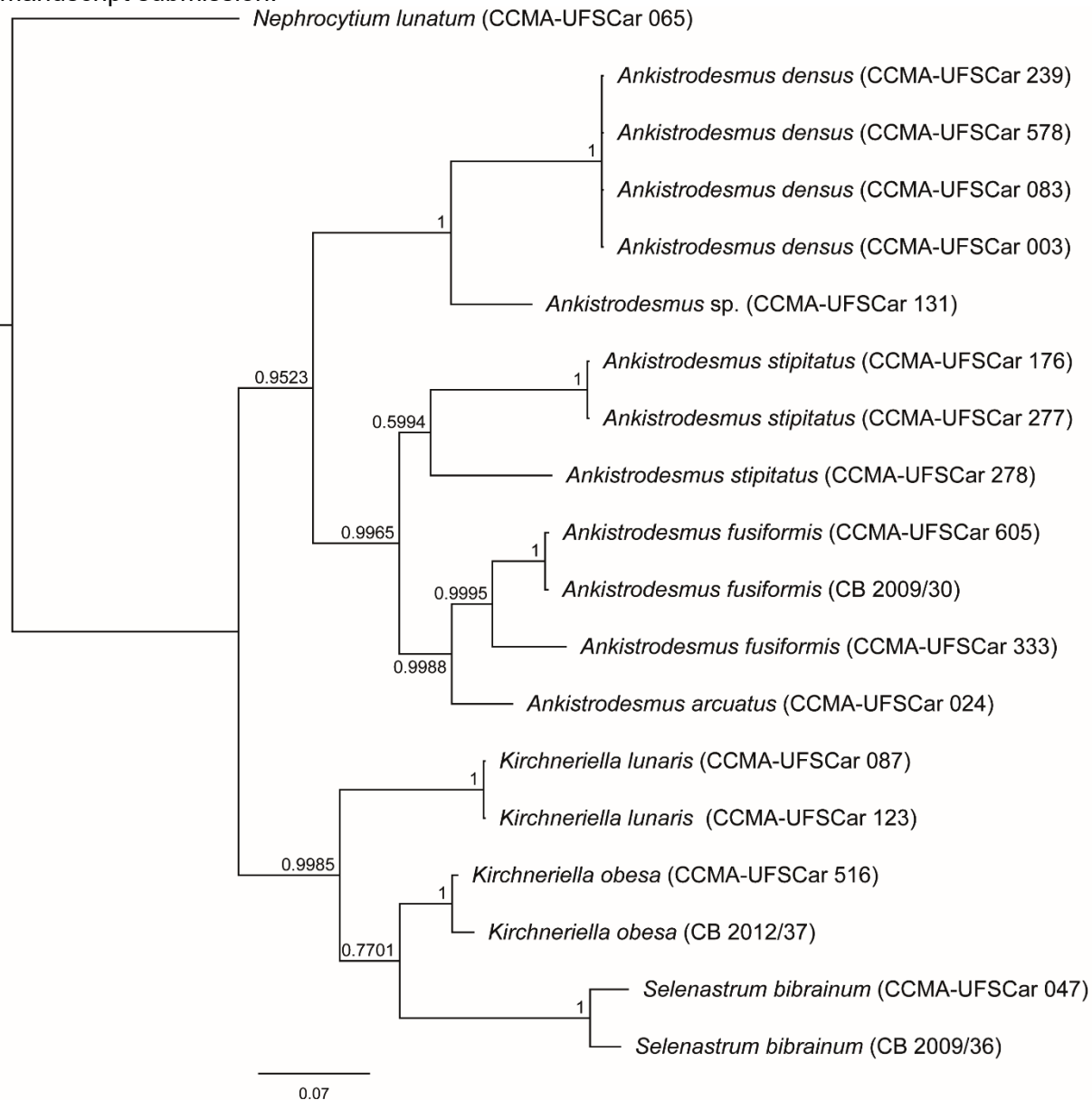


90

91

92

SM 4.2. Phylogeny, performed with the *tufA* gene, between the used strains for MALDI-TOF MS analysis. The phylogenetic analysis with *tufA* gene was performed following the methods of Bagatini et al 2022, sequences are partially published in Vieira et al. 2016, Barreto-Filho et al. 2022 and Bagatini et al. 2022, the remaining sequences will be deposited at NCBI for manuscript submission.



4.8. References

- AIOSA, N.; SINHA, A.; ALBATAINEH, H.; PHILLIPS, A. M.; MAGEENEY, C. M.; WILDE, D. S.; WILLIAMS, K. P.; COLLETTE, N. M.; BRANDA, S. S.; GARG, N. Whole-Cell MALDI-ToF MS Coupled with Untargeted Metabolomics Facilitates Investigations of Microbial Chemical Interactions. **ChemBioChem**, v. 24, n. 7, p. e202200802, 2023.
- BAGATINI, I. L.; MECCHERI, F. S.; PAULSEN, B. S.; GARCIA DA SILVA, T.; BARSETT, H.; HENRIQUES VIEIRA, A. A. Diversity of monosaccharides and glycosidic linkages on extracellular polysaccharides of the microalga *Ankistrodesmus* (Chlorophyceae). **Phycologia**, v. 62, n. 1, p. 36–47, 2023.
- BARBANO, D.; DIAZ, R.; ZHANG, L.; SANDRIN, T.; GERKEN, H.; DEMPSTER, T. Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- BARRETO FILHO, M. M.; VIEIRA, H. H.; MORRIS, J. J.; BAGATINI, I. L. Species-specific effects and the ecological role of programmed cell death in the microalgae *Ankistrodesmus* (Sphaeropleales, Selenastraceae). **Biology Letters**, v. 18, n. 10, p. 20220259, 2022.
- BELL, W.; MITCHELL, R. CHEMOTACTIC AND GROWTH RESPONSES OF MARINE BACTERIA TO ALGAL EXTRACELLULAR PRODUCTS. **The Biological Bulletin**, v. 143, n. 2, p. 265–277, 1972. Disponível em: <<https://doi.org/10.2307/1540052>>.
- BOROWITZKA, M. A. Chemically-Mediated Interactions in Microalgae. In: BOROWITZKA, M. A.; BEARDALL, J.; RAVEN, J. A. **The Physiology of Microalgae**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 321–357.
- CHO, D.-H.; RAMANAN, R.; HEO, J.; LEE, J.; KIM, B.-H.; OH, H.-M.; KIM, H.-S. Enhancing microalgal biomass productivity by engineering a microalgal–bacterial community. **Bioresource technology**, v. 175, p. 578–585, 2015.
- CIRRI, E.; POHNERT, G. Algae–bacteria interactions that balance the planktonic microbiome. **New Phytologist**, v. 223, n. 1, p. 100–106, 2019.
- DAYRAT, B. Towards integrative taxonomy. **Biological journal of the Linnean society**, v. 85, n. 3, p. 407–417, 2005.
- DE QUEIROZ, K. Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology**, v. 56, n. 6, p. 879–886, 2007.

- DEXTER, E.; ROLLWAGEN-BOLLENS, G.; BOLLENS, S. M. The trouble with stress: A flexible method for the evaluation of nonmetric multidimensional scaling. **Limnology and Oceanography: Methods**, v. 16, n. 7, p. 434–443, 2018.
- EMAMI, K.; HACK, E.; NELSON, A.; BRAIN, C. M.; LYNE, F. M.; MESBAHI, E.; DAY, J. G.; CALDWELL, G. S. Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- GARCIA DA SILVA, T.; BOCK, C.; SANT'ANNA, L. C.; BAGATINI, L. I.; WODNIOK, S.; VIEIRA, H. A. A. 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**, v. 17, n. 1, p. 1–19, 2017. Disponível em: <<https://fottea.czechphycology.cz/artkey/fot-201701-0001.php>>.
- GARCIA, T. S.; BOCK, C.; BAGATINI, I. L.; ARCHANJO, N. C. P.; SANT'ANNA, C. L.; VIEIRA, A. A. H. Hidden diversity in Selenastraceae (Sphaeropleales, Chlorophyceae): Molecular phylogeny revealed a nannoplanktonic species, with the description of *Viridiparva madeirensis* gen. et sp. nov. **Algal Research**, v. 68, p. 102886, 2022.
- GIBB, S. MALDIquantForeign: import/export routines for MALDIquant. **R package version 0.12**, 2019.
- GIBB, S.; STRIMMER, K. Maldiquant: A versatile R package for the analysis of mass spectrometry data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 17, p. 2270–2271, 2012.
- GRIFFITHS, M. J.; GARCIN, C.; VAN HILLE, R. P.; HARRISON, S. T. L. Interference by pigment in the estimation of microalgal biomass concentration by optical density. **Journal of microbiological methods**, v. 85, n. 2, p. 119–123, 2011.
- KOUZUMA, A.; WATANABE, K. Exploring the potential of algae/bacteria interactions. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 33, p. 125–129, 2015.
- KRIENITZ, L.; BOCK, C.; NOZAKI, H.; WOLF, M. SSU rRNA gene phylogeny of morphospecies affiliated to the bioassay alga “*Selenastrum capricornutum*” recovered the polyphyletic origin of crescent-shaped chlorophyta. **Journal of Phycology**, v. 47, n. 4, p. 880–893, 2011.
- LANDA, M.; BLAIN, S.; CHRISTAKI, U.; MONCHY, S.; OBERNOSTERER, I. Shifts in bacterial community composition associated with increased carbon cycling in a mosaic of phytoplankton blooms. **The ISME journal**, v. 10, n. 1, p. 39–50, 2016.

- LEE, F. W.-F.; HO, K. C.; LO, S. C.-L. Rapid identification of dinoflagellates using protein profiling with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Harmful Algae**, v. 7, n. 4, p. 551–559, 2008.
- MALAVASI, V.; ŠKALOUD, P.; RINDI, F.; TEMPESTA, S.; PAOLETTI, M.; PASQUALETTI, M. DNA-based taxonomy in ecologically versatile microalgae: a re-evaluation of the species concept within the coccoid green algal genus *Coccomyxa* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0151137, 2016.
- MARTIN-PLATERO, A. M.; CLEARY, B.; KAUFFMAN, K.; PREHEIM, S. P.; MCGILLICUDDY, D. J.; ALM, E. J.; POLZ, M. F. High resolution time series reveals cohesive but short-lived communities in coastal plankton. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 266, 2018.
- MELLO, R. V.; MECCHERI, F. S.; BAGATINI, I. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIEIRA, A. A. H. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, p. 151–160, 2017.
- MURUGAIYAN, J.; AHRHOLDT, J.; KOWBEL, V.; ROESLER, U. 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*. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 5, p. 461–467, 2012.
- OKSANEN, J.; BLANCHET, F. G.; KINDT, R.; LEGENDRE, P.; MINCHIN, P. R.; O'HARA, R. B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. Package 'vegan'. **Community ecology package, version**, v. 2, n. 9, p. 1–295, 2013.
- PALAREA-ALBALADEJO, J.; MCLEAN, K.; WRIGHT, F.; SMITH, D. G. E. MALDIrrpa: Quality control and robust analysis for mass spectrometry data. **Bioinformatics**, v. 34, n. 3, p. 522–523, 2018.
- RAMANAN, R.; KANG, Z.; KIM, B.-H.; CHO, D.-H.; JIN, L.; OH, H.-M.; KIM, H.-S. Phycosphere bacterial diversity in green algae reveals an apparent similarity across habitats. **Algal Research**, v. 8, p. 140–144, 2015.
- SARAÇLI, S.; DOĞAN, N.; DOĞAN, İ. Comparison of hierarchical cluster analysis methods by cophenetic correlation. **Journal of inequalities and Applications**, v. 2013, n. 1, p. 1–8, 2013.

- 199 SCHLICK-STEINER, B. C.; STEINER, F. M.; SEIFERT, B.; STAUFFER, C.;
200 CHRISTIAN, E.; CROZIER, R. H. Integrative taxonomy: a multisource approach to
201 exploring biodiversity. **Annual review of entomology**, v. 55, p. 421–438, 2010.
- 202 SEYMOUR, J. R.; AMIN, S. A.; RAINA, J.-B.; STOCKER, R. Zooming in on the
203 phycosphere: the ecological interface for phytoplankton–bacteria relationships.
204 **Nature microbiology**, v. 2, n. 7, p. 1–12, 2017.
- 205 ŠKALOUD, P.; RINDI, F. Ecological differentiation of cryptic species within an asexual
206 protist morphospecies: a case study of filamentous green alga *Klebsormidium*
207 (Streptophyta). **Journal of eukaryotic microbiology**, v. 60, n. 4, p. 350–362,
208 2013.
- 209 TEELING, H.; FUCHS, B. M.; BENNKE, C. M.; KRÜGER, K.; CHAFEE, M.;
210 KAPPELMANN, L.; REINTJES, G.; WALDMANN, J.; QUAST, C.; GLÖCKNER, F.
211 O. Recurring patterns in bacterioplankton dynamics during coastal spring algae
212 blooms. **elife**, v. 5, p. e11888, 2016.
- 213 WARNES, M. G. R.; BOLKER, B.; BONEBAKKER, L.; GENTLEMAN, R.; HUBER, W.
214 Package ‘gplots’. **Various R programming tools for plotting data**, 2016.
- 215 YANG, Y.; LIN, Y.; QIAO, L. Direct MALDI-TOF MS identification of bacterial mixtures.
216 **Analytical chemistry**, v. 90, n. 17, p. 10400–10408, 2018.
- 217 ZHANG, L.; SMART, S.; SANDRIN, T. R. Biomarker-and similarity coefficient-based
218 approaches to bacterial mixture characterization using matrix-assisted laser
219 desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS).
220 **Scientific reports**, v. 5, n. 1, p. 15834, 2015.

5 DISCUSSÃO GERAL

A espectrometria de massas por MALDI-TOF é uma técnica que permite a identificação de diversas amostras com pequenas quantidades de biomassa de maneira rápida e prática. Sua utilização se estende desde o meio acadêmico até o meio industrial, sendo que uma das principais aplicações está no meio clínico. Em todas essas aplicações existe um aspecto fundamental para seu funcionamento: o banco de dados de espectros de referência.

Existem bancos de dados comerciais que possibilitam a identificação de microrganismos como fungos, bactérias e vírus por espectrometria com MALDI-TOF, bem como iniciativas de construções de bancos de dados colaborativos. A expansão destes bancos tem se mostrado um passo importante na consolidação desta técnica, possibilitando resultados cada vez mais precisos (CALDERARO *et al.*, 2014; DE CAROLIS *et al.*, 2014; NORMAND *et al.*, 2017; PETRY *et al.*, 2019; SANITÁ LIMA *et al.*, 2019). A ausência de microalgas em quaisquer um desses bancos é notória.

A capacidade de utilizar esta técnica na caracterização de microalgas já se mostrou eficiente (BARBANO *et al.*, 2015; EMAMI *et al.*, 2015; MELLO *et al.*, 2017; MURUGAIYAN *et al.*, 2012). Aqui demonstramos que além da caracterização é possível estabelecer um banco de dados, em um *software* livre, com espectros de referência que possibilita a identificação confiável de amostras de microalgas em nível de cepa e espécie. Nossos resultados também apontam para a possibilidade de identificação a nível de gênero com a expansão do número de espectros contidos no banco de dados.

As análises de similaridade, realizadas com os espectros, ainda permitiram a identificação correta de amostras cultivadas sob diferentes condições de cultivo como volume da cultura, luminosidade (intensidade e qualidade) e pH. Também foram corretamente identificadas cepas que tiveram espectros obtidos em um equipamento MALDI-TOF diferente. Somente a amostra cultivada em uma condição de temperatura mais alta não foi identificada corretamente a nível de espécie.

A identificação das microalgas, cultivadas sob diferentes condições abióticas, representa um importante aspecto da aplicação desta técnica, pois a produção de metabólitos de interesse econômico pode ser estimulada de acordo com esses parâmetros (SHARMA; SCHUHMANN; SCHENK, 2012; SUN *et al.*, 2018). Além disso, a identificação de amostras ambientais também depende dessa capacidade.

Amostras ambientais compreendem organismos que não estão sob as condições controladas de um laboratório e que se encontram constantemente em condições adversas e/ou de estresse. Outro importante fator das amostras ambientais é que elas não são puras, ou seja, mesmo que uma única espécie de microalga esteja presente, diversos outros microrganismos estarão presentes também.

Os resultados aqui obtidos mostram que o cocultivo das microalgas com populações bacterianas afeta a produção de compostos intracelulares algais, na faixa de 2.000 a 20.000 Da. Também foi possível verificar que algumas cepas, como a *Ankistrodesmus stipitatus*, por exemplo, apresentaram espectros semelhantes nos três tratamentos, diferenciando-se das cepas 277 e 176, que estão classificadas com pertencentes à essa mesma espécie. Essas duas últimas, por sua vez, apresentaram maior semelhança entre elas, mas separadas pelos diferentes tratamentos. As cepas 277 e 278 foram isoladas de um mesmo ambiente e na mesma data. Esta distância entre essas duas cepas indica um possível processo de diferenciação de linhagens devido à reprodução assexuada, com a formação de um gradiente de especiação.

A cepas de *Ankistrodesmus densus* e *Ankistrodesmus fusiformis* apresentaram uma grande semelhança entre os espectros delas quando em interação com as bactérias. Em todos os tratamentos a separação de gêneros ficou evidente. Estes resultados reforçam o potencial desta técnica como uma ferramenta que pode fornecer dados importantes na delimitação específica do grupo em um aspecto ecológico, ainda que precise ser aprimorada para isso.

Os resultados com os espectros das cepas 131 (*Ankistrodesmus* sp.) e 024 (*Ankistrodesmus arcuatus*) forneceram importantes indicações para a delimitação específica delas. Essas duas cepas possuem um posicionamento taxonômico e filogenético inconclusivo até o presente, sendo que nossas análises indicam que a cepa 131 é de fato uma espécie diferente das demais espécies que analisamos do gênero *Ankistrodesmus*, e é possivelmente uma espécie nova não descrita. Já a cepa 024 está possivelmente classificada de maneira equivocada como *A. arcuatus*, pois os espectros dessa cepa apresentam grande similaridade com os espectros das cepas de *Ankistrodesmus fusiformis*, que seria portanto a sua identificação mais adequada.

O estudo de Yang et al. (2018), com cocultivos e misturas de cepas bacterianas, contou com o uso de um banco de dados de referência contendo espectros de 1081 cepas. Ainda assim, identificações confiáveis somente puderam

ser obtidas em amostras com misturas de até três cepas. Nosso estudo busca implementar um banco de dados que pode conferir maior precisão e robustez à identificação das microalgas e obter um melhor entendimento da diversidade do grupo.

5.1. Referências

- BARBANO, D.; DIAZ, R.; ZHANG, L.; SANDRIN, T.; GERKEN, H.; DEMPSTER, T. Rapid characterization of microalgae and microalgae mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.
- CALDERARO, A.; MOTTA, F.; MONTECCHINI, S.; GORRINI, C.; PICCOLO, G.; PIERGIANNI, M.; BUTTRINI, M.; MEDICI, M. C.; ARCANGELETTI, M. C.; CHEZZI, C. Identification of dermatophyte species after implementation of the in-house MALDI-TOF MS database. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 9, p. 16012–16024, 2014.
- DE CAROLIS, E.; VELLA, A.; VACCARO, L.; TORELLI, R.; POSTERARO, P.; RICCIARDI, W.; SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B. Development and validation of an in-house database for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based yeast identification using a fast protein extraction procedure. **Journal of clinical microbiology**, v. 52, n. 5, p. 1453–1458, 2014.
- EMAMI, K.; HACK, E.; NELSON, A.; BRAIN, C. M.; LYNE, F. M.; MESBAHI, E.; DAY, J. G.; CALDWELL, G. S. Proteomic-based biotyping reveals hidden diversity within a microalgae culture collection: An example using *Dunaliella*. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.
- MELLO, R. V.; MECCHERI, F. S.; BAGATINI, I. L.; RODRIGUES-FILHO, E.; VIEIRA, A. A. H. MALDI-TOF MS based discrimination of coccoid green microalgae (Selenastraceae, Chlorophyta). **Algal Research**, v. 28, p. 151–160, 2017.
- MURUGAIYAN, J.; AHRHOLDT, J.; KOWBEL, V.; ROESLER, U. 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*. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 5, p. 461–467, 2012.

- 320 NORMAND, A.-C.; CASSAGNE, C.; GAUTIER, M.; BECKER, P.; RANQUE, S.;
321 HENDRICKX, M.; PIARROUX, R. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based
322 identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference
323 databases. **BMC microbiology**, v. 17, n. 1, p. 1–17, 2017.
- 324 PETRY, S.; PY, J.-S.; WILHELM, A.; DUQUESNE, F.; BÄYON-AUBOYER, M.-H.;
325 MORVAN, H.; GASSILLOUD, B. Evaluation of MALDI-TOF MS and an expanded
326 custom reference spectra database for the identification and differentiation of
327 *Taylorella equigenitalis* and *Taylorella asinigenitalis*. **Diagnostic Microbiology**
328 **and Infectious Disease**, v. 94, n. 4, p. 326–330, 2019.
- 329 SANITÁ LIMA, M.; COUTINHO DE LUCAS, R.; LIMA, N.; POLIZELI, M. de L. T. de M.;
330 SANTOS, C. Fungal community ecology using MALDI-TOF MS demands curated
331 mass spectral databases. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 315, 2019.
- 332 SHARMA, K. K.; SCHUHMANN, H.; SCHENK, P. M. High lipid induction in microalgae
333 for biodiesel production. **Energies**, v. 5, n. 5, p. 1532–1553, 2012.
- 334 SUN, X.-M.; REN, L.-J.; ZHAO, Q.-Y.; JI, X.-J.; HUANG, H. Microalgae for the
335 production of lipid and carotenoids: a review with focus on stress regulation and
336 adaptation. **Biotechnology for biofuels**, v. 11, p. 1–16, 2018.
- 337 YANG, Y.; LIN, Y.; QIAO, L. Direct MALDI-TOF MS identification of bacterial mixtures.
338 **Analytical chemistry**, v. 90, n. 17, p. 10400–10408, 2018.

6 CONCLUSÕES

A utilização de espectrometria de massas por MALDI-TOF mostrou ter ampla capacidade de identificação e distinção de cepas e espécies de microalgas. Para o aprimoramento desta técnica o estabelecimento de bancos de dados com espectros de referência é fundamental, sendo que com a ampliação dele a identificação pode se tornar mais robusta e confiável. Mesmo com um número ainda limitado de amostras a identificação com nosso banco de dados se mostrou eficiente, inclusive quando testado culturas realizadas sob diferentes condições abióticas. A expansão destes dados pode ainda permitir a realização de análises de relações filogenéticas entre esses organismos.

Esta técnica pôde também detectar diferenças nos espectros das microalgas quando comparando cultivos axênicos e cocultivos com bactérias. O perfil químico dos espectros das células apresentou alterações em resposta às interações, sendo que mesmo com essas mudanças, as distinções de cepas, espécies e gêneros ainda foi satisfatória. Também pudemos detectar que espécies diferentes podem apresentar respostas análogas quanto a essa produção de compostos quando na presença das bactérias isoladas (cepas das espécies *Ankistrodesmus densus* e *Ankistrodesmus fusiformis*). Assim como cepas próximas podem apresentar respostas distintas, reforçando ser espécies distintas (cepa CCMA-UFSCar 131 – *Ankistrodesmus* sp.). Esses dados podem ainda reforçar que cepas distintas podem pertencer a uma mesma espécie, como no caso da cepa CCMA-UFSCar 024 que está classificada atualmente como *A. arcuatus*, mas deve ser *A. fusiformis*. Assim esses resultados podem ser de grande valia para a delimitação de específica em um contexto ecológico e integrativo.