

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO DE MICROBIOLOGIA

Bruna Barbosa Fagundes Botelho

DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE METODOLOGIAS
VISANDO A PROSPECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS VÍRUS
ASSOCIADOS A MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS

Belo Horizonte

2024

Bruna Barbosa Fagundes Botelho

**DESENVOLVIMENTO E PADRONIZAÇÃO DE
METODOLOGIAS VISANDO A PROSPECÇÃO E
CARACTERIZAÇÃO DE NOVOS VÍRUS ASSOCIADOS A
MICROALGAS E CIANOBACTÉRIAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Microbiologia.

Orientador: Professor Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

Belo Horizonte

2024

043

Botelho, Bruna Barbosa Fagundes.

Desenvolvimento e padronização de metodologias visando a prospecção e caracterização de novos vírus associados a microalgas e cianobactérias [manuscrito] / Bruna Barbosa Fagundes Botelho. – 2024.

206 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Professor Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Chlorella. 3. Clorófitas. 4. Cianobactérias. 5. Vírus. I. Rodrigues, Rodrigo Araújo Lima. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE **BRUNA BARBOSA FAGUNDES BOTELHO**

Nº REGISTRO: 2022660956

Às 14:00 horas do dia **28 de março de 2024**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Nídia Esther Colquehuanca Arias (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG), Thalita Souza Arantes (FAMINAS-BH) e o Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues (Orientador), para julgar o trabalho final "**Desenvolvimento e padronização de metodologias visando a prospecção e caracterização de novos vírus associados a microalgas e cianobactérias**", da aluna **Bruna Barbosa Fagundes Botelho**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 28 de março de 2024

Membros da banca:

Dra. Nídia Esther Colquehuanca Arias

Dra. Thalita Souza Arantes

De acordo:

Prof. Dr. Rodrigo Araújo Lima Rodrigues

(Orientador)

Prof. Dr. Daniel de Assis Santos

(Coordenador do Programa de Pós-graduação)



Documento assinado eletronicamente por **Daniel de Assis Santos, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 01/04/2024, às 08:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Professor do Magistério Superior**, em 01/04/2024, às 08:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **THALITA SOUZA ARANTES, Usuário Externo**, em 01/04/2024, às 09:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nidia Esther Colquehuanca Arias, Usuária Externa**, em 03/04/2024, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **3115659** e o código CRC **9C82AA0C**.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos
não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA (filo *Nucleocytoviricota*) são vírus que possuem características ímpares e que desafiam a própria definição de vírus. Fazem parte desse filo os *chlorovirus*, que são vírus com grandes partículas e genomas complexos que infectam microalgas do tipo *Chlorella*. Seu genoma viral contém diversos genes que codificam tRNAs e proteínas, incluindo enzimas envolvidas no metabolismo energético e na síntese de macromoléculas, além de centenas de regiões codificadoras (CDS) nunca antes identificadas em outros organismos. Assim, o isolamento e a caracterização de novos chlorovírus, apresentam grande potencial para a descoberta e caracterização de novas proteínas. Apesar de já terem sido identificados em diversas localidades e o Brasil ser um hotspot de biodiversidade, estes vírus não são explorados por aqui. O mesmo ocorre com os cianófagos, que são vírus que infectam cianobactérias e são importantes reguladores da sua abundância e composição. Como a descoberta e caracterização destes vírus supracitados é tão importante, faz-se também, imprescindível o desenvolvimento, adaptação e padronização de técnicas que permitam o isolamento e a caracterização de vírus de algas e cianobactérias. Neste trabalho serão abordados os vírus que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*, amplamente distribuídas pelo mundo e que causam eflorescências algais, um fenômeno comum caracterizado pela proliferação celular exacerbada. Paradoxalmente, a essa distribuição, vírus que infectam essas cianobactérias só foram isolados em alguns países do oriente até então. Explorar novos ambientes em busca de cianófagos pode auxiliar na compreensão deste grupo tão diverso e novos isolados podem ajudar na resolução das lacunas relacionadas à filogenia e biologia destes vírus. Sendo assim o objetivo geral deste trabalho foi definir, testar e padronizar métodos visando o isolamento e a caracterização de novos vírus associados a cianobactérias e microalgas. Para tal, foram feitas curvas de crescimento das algas e cianobactérias, testes de manutenção das células em diferentes meios de cultura, padronização de ensaios de placa, de ensaios de prospecção e de diferentes métodos de titulação, além da caracterização dos efeitos citopáticos por microscopia óptica e eletrônica. Adicionalmente, foram feitas análises genômicas e filogenéticas *in silico* de fagos que infectam *Microcystis*. Para duas das amostras ambientais testadas foi possível observar alterações celulares indicativas de efeito citopático, sendo uma em *Chlorella vulgaris* (incluindo a formação de placas de lise celular em ensaio de placa) e outra em *Microcystis aeruginosa*. Foram estabelecidos protocolos para a realização de prospecções, cultivo, subcultivo e manutenção das células e também preparo de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão que fornece imagens com alta resolução e pode ser usado para todas as células testadas. As análises *in silico* por sua vez, revelaram que o grupo dos cianófagos que infectam *Microcystis* é parafilético e seus genomas variam substancialmente, não existindo blocos sintênicos conservados entre todos os cianófagos, nem COGS compartilhadas por todos. Os resultados deste trabalho sugerem que o uso desses métodos modificados pode fornecer condições para o isolamento dos primeiros vírus que infectam algas do gênero *Chlorella* e cianófagos brasileiros.

Palavras-chave: Prospecção viral; chlorovírus; cianófagos; algas verdes; cianobactérias; clorelas; metodologias; caracterização de vírus ambientais.

ABSTRACT

Large nucleocytoplasmic DNA viruses (phylum *Nucleocytoviricota*) are viruses with unique characteristics that defy the very definition of a virus. This phylum includes chloroviruses, which are viruses with large particles and complex genomes that infect *chlorella-like* microalgae. Their viral genome contains several genes that encode tRNAs and proteins, including enzymes involved in energy metabolism and the synthesis of macromolecules, as well as hundreds of coding regions (CDS) never before identified in other organisms. Thus, the isolation and characterization of new chloroviruses has great potential for the discovery and characterization of new proteins. Although these viruses have already been identified in various locations and Brazil is a biodiversity hotspot, they have not been explored here. The same occurs with cyanophages, which are viruses that infect cyanobacteria and are important regulators of their abundance and composition. As the discovery and characterization of these aforementioned viruses is so important, it is also essential to develop, adapt and standardize techniques that enable the isolation and characterization of viruses from algae and cyanobacteria. In this work we focused on viruses that infect cyanobacteria of the genus *Microcystis*, which are widely distributed throughout the world and cause algal blooms, a common phenomenon characterized by exacerbated cell proliferation. Paradoxically, viruses infecting these cyanobacteria have only been isolated in a few eastern countries. Exploring new environments in search of cyanophages can help to understand this diverse group and new isolates can help to solve the gaps related to the phylogeny and biology of these viruses. The objective of this work was to define, test and standardize methods for isolating and characterizing new viruses associated with cyanobacteria and microalgae. To achieve that, algae and cyanobacteria growth curves, cell maintenance tests in different culture media, standardization of plaque assays, prospecting assays and different titration methods were carried out, as well as characterization of cytopathic effects by optical and electron microscopy. In addition, *in silico* genomic and phylogenetic analyses of phages that infect *Microcystis* were carried out. For two of the several environmental samples tested, it was possible to observe cellular alterations indicative of a cytopathic effect, one in *Chlorella vulgaris* (including the formation of cell lysis plaques in a plaque assay) and the other in *Microcystis aeruginosa*. Protocols were established for prospecting, cultivating, subculturing and maintaining the cells, as well as preparing samples for Transmission Electron Microscopy, which provides high-resolution images and can be used for all the cells tested. *In silico* analysis revealed that the group of cyanophages that infect *Microcystis* is paraphyletic and their genomes vary substantially, with no syntenic blocks conserved between all cyanophages, nor COGS shared by all. The results of this work suggest that the use of these modified methods may provide conditions for the isolation of the first brazilian viruses infecting algae of the genus *Chlorella* and cyanophages.

Keywords: Chlorovirus surveying; cyanophage surveying; green algae; cyanobacteria; chlorella; methodologies; characterization of environmental viruses.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Filogenia do filo *Nucleocyotviricota*
- Figura 2 – Placas de lise formadas pelo PBCV-1
- Figura 3 – Filogenias dos chlorovírus e das algas hospedeiras
- Figura 4 – Representações da partícula viral do PBCV-1
- Figura 5 – Ciclo de multiplicação do PBCV-1
- Figura 6 – Representação do início do ciclo de multiplicação do PBCV-1
- Figura 7 – Micrografias eletrônicas de transmissão de *C. variabilis* Syngen 2-3 infectada e não infectada pelo OSy-NE5
- Figura 8 – Árvore filogenética do *Chlorella* vírus XW01 (CV-XW01)
- Figura 9 – Micrografias do vírus CV-XW01 e seu virófago CVv-SW01
- Figura 10 – Esquema representando a reprodução assexuada das *Chlorellas*
- Figura 11 – Esquema representando a ultraestrutura da *C. vulgaris*
- Figura 12 – Micrografias de diferentes cianófagos
- Figura 13 – Países nos quais os cianófagos de *Mycrocystis* já foram isolados
- Figura 14 – Ciclo de multiplicação de bacteriófagos
- Figura 15 – Células de *Microcystis aeruginosa*
- Figura 16 – Micrografias evidenciando as estruturas celulares de *Microcystis aeruginosa*
- Figura 17 – Fenômeno de eflorescência algal
- Figura 18 – Distribuição Global dos *blooms* de causados por cianobactérias do gênero *Microcystis*
- Figura 19 – Locais nos quais foram isolados vírus gigantes no Brasil
- Figura 20 – Locais de onde foram isolados chlorovírus no planeta até o momento
- Figura 21 – Representação da placa de 96 poços utilizada para definir o melhor número de células/poço
- Figura 22 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* MG
- Figura 23 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* Syngen 2-3
- Figura 24 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* SC
- Figura 25 – Curva de crescimento: *Chlorella minutissima*
- Figura 26 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* NC64A - Cultivo com antimicrobiano

Figura 27 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* NC64A

Figura 28 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* MG - Cultivo com antimicrobiano

Figura 29 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* SC - Cultivo com antimicrobiano

Figura 30 – Efeito de *ghost cells* sobre a cultura

Figura 31 – Curva de crescimento: *Chlorella minutissima*- Cultivo com antimicrobiano

Figura 32 – Comparação entre as células cultivadas sem antimicrobiano e as células cultivadas com antimicrobianos

Figura 33 –*Slants* e culturas provenientes destes

Figura 34 – Padronização dos ensaios de placa

Figura 35 – Padronização dos ensaios de placa em placas de Petri

Figura 36 – Avaliação do efeito de microrganismos co-cultivados com as células hospedeiras nos ensaios de placa

Figura 37 – Avaliação do número de células/poço

Figura 38 – Prospecção em meio líquido: resultados observados

Figura 39 – Diferentes métodos utilizados para os ensaios de placa usando células de *Microcystis aeruginosa*

Figura 40 – Resultado dos ensaios de placas - Placas de Petri

Figura 41 – Resultado dos ensaios de placas - Técnica de *droplet*

Figura 42 – Resultado do ensaio de placa realizado empregando método *spot*

Figura 43 – Resultado dos ensaios realizados empregando método *spot* modificado

Figura 44 – Resultado do ensaio de TCID50

Figura 45 – Micrografias evidenciando a diferença entre as células infectadas e não infectadas

Figura 46 – Validação do ensaio de TCID50 utilizando soluções estoque de PBCV-1

Figura 47 – Micrografias evidenciando possível efeito citopático causado pelo isolado 7S

Figura 48 – Presença de grandes aglomerados de restos celulares

Figura 49 – Análise de sintenia dos cianófitos

Figura 50 –Diagramas de Venn evidenciando os COGs compartilhados entre os

cianófagos

Figura 51 – Árvore filogenética dos cianófagos

Figura 52 – Etapa de expansão às cegas

Figura 53 – Placas de lise causadas pelos isolados

Figura 54 – Aspecto macroscópico das células infectadas comparadas às células não infectadas

Figura 55 – Gráfico de amplificação resultante do ensaio piloto

Figura 56 – Grandes placas de lise causadas pelo isolado 127 colabam

Figura 57 – Tamanho das placas de lise 96 horas pós-infecção e 192 horas pós-infecção

Figura 58 – Tamanho das placas de lise 48 horas pós-infecção

Figura 59 – Validação da titulação por ensaio de placa

Figura 60 – Efeito do congelamento sobre a infectividade do isolado

Figura 61 – Caracterização do efeito citopático do isolado 127

Figura 62 – Aspecto geral das células infectadas pelo isolado 127

Figura 63 – Diferentes protocolos de preparo das amostras geram micrografias com boa resolução

Figura 64 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Microcystis aeruginosa*

Figura 65 – Detalhe das estruturas celulares de *Microcystis aeruginosa*

Figura 66 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Chlorella variabilis* NC64A

Figura 67 – Aspecto geral das células não infectadas e infectadas

Figura 68 – Micrografias eletrônicas de células de *Microcystis aeruginosa* infectadas comparadas às células não infectadas

Figura 69 – Aspecto geral das células infectadas pelo isolado 127 comparado ao aspecto geral dos controles celulares

Figura 70 – Restos de parede celular sendo evidenciados

Figura 71 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Chlorella vulgaris* não infectada

Figura 72 – Estruturas semelhantes a plastoglóbulos vistas no controle celular e descritas na literatura

Figura 73 – Estruturas semelhantes a platoglóbulos no cloroplasto de células infectadas (4 dias pós-infecção)

Figura 74 – Regiões de invaginações entre o citoplasma e a parede celular com

estruturas semelhantes a centros de montagem de chlorovírus

Figura 75 - Estruturas semelhantes aos centros de montagem

Figura 76 – Região no citoplasma semelhante ao centro de montagem dos chlorovírus comparada a um centro de montagem

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Cianófagos que infectam *Microcystis sp.* descritos até o momento

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para realização dos ensaios de placa em placa de 24 poços

Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados no ensaio piloto de qPCR

Tabela 4 – Resumo das diferentes amostras preparadas

Tabela 5 – Diferentes características dos cianófagos que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, SÍMBOLOS E UNIDADES

%	Porcentagem
/	Divisão
BBM	<i>Bold basal medium</i>
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	<i>Base pair</i>
CDS	<i>Coding DNA Sequence</i>
COG	<i>Clusters of Orthologous Groups</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
CV-XW01	Chlorella virus XW01
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ssDNA	DNA de fita simples
dsDNA	DNA de fita dupla
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
h	Hora
HIV	<i>Human immunodeficiency virus</i>
ICTV	<i>International Committee on Taxonomy of Viruses</i>
kbp	Kilobases
log	Logarítmica
M	Molar
M.O.I.	Multiplicidade de infecção
Mbp	Megabases
ME	Microscopia eletrônica
Micra	Micrômetros
mL	Mililitros
mRNA	RNA mensageiro
nm	Nanômetros
NCLDV	<i>Nucleocytoplasmic Large DNA Virus</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
ORFan	ORF sem homologia detectável com bancos de dados genéticos
PBCV-1	<i>Paramecium bursaria Chlorella virus-1</i>
PERD	Parque Estadual do Rio Doce
pH	Potencial hidrogeniônico

qPCR	<i>Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
Rpm	Rotações por minuto
ssRNA	RNA de fita simples
dsRNA	RNA de fita dupla
(-)RNA	RNA de fita simples sentido negativo
(+)RNA	RNA de fita simples sentido positivo
SARS-CoV-2	<i>Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2</i>
TMV	Vírus do mosaico do tabaco
tRNA	RNA transportador
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFP	Unidade formadora de placa
VLP	<i>Virus like particle</i>
xg	Força g
°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μM	Micromolar
μm	Micrômetros

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Entidades biológicas únicas na biosfera: os vírus.....	19
1.2. Vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA.....	21
1.3. Vírus que infectam algas do gênero <i>Chlorella</i>	22
1.3.1. O gênero <i>Chlorovirus</i>	23
1.3.2. Estrutura da partícula viral dos chlorovírus.....	26
1.3.3. Ciclo de multiplicação dos chlorovírus.....	27
1.3.4. Potencial biotecnológico das enzimas de chlorovírus.....	29
1.3.5. Alterações morfológicas causadas pelos chlorovírus.....	30
1.3.6. Um novo vírus capaz de infectar clorelas de vida livre.....	31
1.3.7. Os hospedeiros: Algas do gênero <i>Chlorella</i>	34
1.4. Vírus que infectam cianobactérias.....	36
1.4.1. Cianófagos: um grupo altamente diverso.....	38
1.4.2. Ciclo de multiplicação dos cianófagos.....	38
1.4.3. O hospedeiro: cianobactérias do gênero <i>Microcystis</i>	39
1.4.4. <i>Cyanoblooms</i>	42
1.4.5. Cianófagos como alternativa para controle biológico.....	44
1.5. Perspectivas para isolamento de cianófagos e chlorovírus no Brasil.....	45
1.6. Importância do desenvolvimento de metodologias na virologia.....	47
2. JUSTIFICATIVA	50

3.

OBJETIVOS	52
3.1. Objetivo geral.....	52
3.2. Objetivos específicos.....	52
4. METODOLOGIA	53
4.1. Obtenção de amostras ambientais.....	53
4.2. Obtenção de culturas de algas do gênero <i>Chlorella</i> e <i>Microcystis aeruginosa</i>	53
4.3. Cultivo e manutenção das algas e cianobactéria.....	53
4.3.1. Curvas de crescimento das algas e cianobactéria.....	54
4.3.2. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias cultivadas em meio contendo antimicrobiano.....	55
4.3.3. Preservação dos estoques celulares em meio sólido.....	55
4.4. Iniciando a prospecção viral.....	55
4.4.1. Etapa de enriquecimento prévio das amostras.....	55
4.4.2. Padronização dos ensaios de placa - Método <i>Double-layer</i>	56
4.4.3. Avaliação da influência de microrganismos cultivados junto às microalgas nos ensaios de placa.....	58
4.4.4. Triagem em placa de 96 poços.....	59
4.5. Prospectando cianófagos.....	60
4.5.1. Prospecção em meio líquido.....	60
4.5.2. Ensaios de placa - <i>Microcystis aeruginosa</i>	60
4.5.3. Análises comparativas genômicas e filogenômicas de fagos que infectam	

<i>Microcystis</i>	61
4.6. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para cianófagos.....	62
4.6.1. <i>Tissue Culture Infectious Dose</i> (TCID50).....	63
4.7. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para vírus que infectam cloreias.....	63
4.7.1. Ensaio de placa - <i>Chlorella vulgaris</i>	63
4.7.2. Purificação das placas de lise.....	64
4.7.3. Produção de estoques virais.....	64
4.7.4. Purificação viral.....	65
4.7.5. Ensaio piloto de Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).....	65
4.7.6. Titulação viral.....	66
4.7.7. Avaliação da estabilidade viral.....	67
4.8. Caracterização dos efeitos citopáticos: microscopia óptica.....	67
4.9. Caracterização dos efeitos citopáticos: Microscopia eletrônica de transmissão.....	67
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
5.1. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias.....	70
5.2. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias cultivadas em meio contendo antimicrobiano.....	74
5.3. Preservação dos estoques celulares em meio sólido.....	81
5.4. Iniciando a prospecção viral.....	81

5.4.1. Padronização dos ensaios de placa.....	81
5.4.2. Avaliação da influência de microrganismos cultivados junto às microalgas nos ensaios de placa.....	84
5.4.3. Triagem em placa de 96 poços.....	85
5.5. Prospectando de cianófagos.....	86
5.5.1. Prospecção em meio líquido.....	86
5.5.2. Ensaios de placa - <i>Microcystis aeruginosa</i>	87
5.6. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para cianófagos.....	91
5.6.1. <i>Tissue Culture Infectious Dose</i> (TCID50).....	91
5.6.2. Caracterização de efeito citopático em <i>Microcystis aeruginosa</i> : Microscopia óptica	93
5.6.3. Análises comparativas genômicas e filogenômicas de fagos que infectam <i>Microcystis</i>	95
5.7. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para vírus que infectam clorelas.....	98
5.7.1. Ensaios de placa - <i>Chlorella vulgaris</i>	98
5.7.2. Produção de estoques virais.....	100
5.7.3. Purificação viral.....	102
5.7.4. Ensaio piloto de Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	103
5.7.5. Titulação viral.....	103
5.7.6. Avaliação da estabilidade viral.....	106
5.7.7. Caracterização de efeito citopático em <i>Chlorella vulgaris</i> : Microscopia óptica.....	107

5.8. Caracterização dos efeitos citopáticos: microscopia eletrônica de transmissão.....	109
6. CONCLUSÕES.....	121
7. PERSPECTIVAS.....	122
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123
10. ANEXOS.....	134

1. INTRODUÇÃO

1.1. Entidades biológicas únicas na biosfera: os vírus

Os vírus são entidades biológicas que possuem características únicas na biosfera. São parasitos intracelulares obrigatórios, ou seja, dependem de uma célula hospedeira e, no entanto, são evolutivamente autônomos, com seus próprios genomas e trajetórias evolutivas (KOONIN *et al.*, 2022). Os vírus estão entrelaçados aos hospedeiros celulares em uma corrida “armamentista” permanente (KOONIN *et al.*, 2020), na qual os hospedeiros desenvolvem e diversificam seus mecanismos de defesa, enquanto os vírus respondem desenvolvendo sistemas que suprimem as defesas do hospedeiro. Interligado à corrida armamentista está o intenso fluxo gênico existente entre os vírus e seus hospedeiros. Os vírus podem adquirir genes do hospedeiro e os empregar para desempenhar funções na multiplicação viral e na interação vírus-hospedeiro. Por outro lado, os hospedeiros podem incorporar os genes dos vírus e os redirecionam para defesa e outras funções celulares (KOONIN *et al.*, 2020; KOONIN *et al.*, 2020).

Todas as formas de vida celular das quais a humanidade tem conhecimento (com exceção de alguns parasitos intracelulares), são hospedeiras de algum vírus conhecido (KOONIN *et al.*, 2020; FORTERRE E PRANGISHVILI, 2009). Os vírus são um grupo amplamente diverso, e a variedade de estruturas, genomas e estratégias de replicação que estes apresentam reflete de milhares a bilhões de anos de coevolução com seus hospedeiros (KRUPOVIC *et al.*, 2023). A ampla gama de tamanhos de genoma de vírus abrange ordens de magnitude, indo desde menos de 2 kilobases (kb) nos menores vírus de RNA e DNA de fita simples (ss, do inglês single-stranded) até mais de 2 megabases (Mb) nos pandoravírus (Legendre *et al.*, 2018). Dessa forma, a virosfera engloba tanto as entidades biológicas mais simples quanto os vírus gigantes, os quais superam alguns procariotos e eucariotos unicelulares em tamanho e complexidade do genoma (KOONIN, *et al.*, 2020). Enquanto as formas de vida celular utilizam como estratégia de armazenamento e expressão das informações genéticas o DNA de fita dupla (dsDNA), transcrito em vários RNAs (inclusive mRNAs, que serão traduzidos em proteínas), os vírus utilizam todos os mecanismos de transmissão de informações possíveis com os dois tipos de ácidos nucleicos, DNA e RNA. Não deixando de obedecer, no entanto, o dogma central da biologia molecular, no qual as informações são transferidas dos ácidos nucleicos para as proteínas, nunca o inverso (KOONIN *et al.*, 2020; KOONIN *et al.*, 2021).

Em 1971, David Baltimore classificou os vírus conhecidos até então em seis classes (posteriormente foi incluída uma sétima classe), baseando-se no tipo de genoma do vírus, sendo elas:

Classe I. Vírus de DNA de fita dupla, com a mesma estratégia de replicação e expressão das formas de vida celular;

Classe II. Vírus de DNA de fita simples (ssDNA);

Classe III. Vírus de RNA de fita dupla (dsRNA);

Classe IV. Vírus de RNA de fita simples (ssRNA) de sentido positivo [(+)RNA];

Classe V. Vírus de RNA de fita simples (ssRNA) sentido negativo [(-)RNA];

Classe VI. Vírus de transcrição reversa de ssRNA que têm genomas de (+)RNA que se replicam por meio de intermediários de DNA;

Classe VII. Vírus que possuem um genoma de dsDNA (embora uma das fitas seja geralmente incompleta) e que usam transcriptase reversa (RT) para se replicar por meio de um intermediário de RNA (KOONIN *et al.*, 2020).

De maneira geral, a percepção da humanidade quanto aos vírus é de que estes são pequenas entidades que causam doenças em humanos e animais, e é possível compreender as razões disto, uma vez que na história humana, estes têm sido responsáveis por grandes surtos e emergências epidemiológicas, tais como a pandemia causada pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e a causada pelo coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2). Esta visão, no entanto, negligencia os demais vírus, uma vez que estes infectam todos os tipos de organismos celulares, sendo as entidades biológicas mais abundantes do planeta (SUTTLE, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2017). Eles são tão abundantes nos ambientes aquáticos, que podem atingir, segundo estimativas, 10^{31} partículas semelhantes a vírus (*virus-like particles*) em todo o planeta. Eles desempenham importantes funções na regulação de populações bacterianas, tendo, dessa forma, o potencial de afetar os ciclos biogeoquímicos (MORIMOTO *et al.*, 2018). Vírus que predam cianobactérias, os cianófagos, por exemplo, são capazes de controlar e inibir o crescimento destes organismos, atuando de forma fundamental no controle populacional destes organismos (WATKINS *et al.*, 2014). Além disso, o impacto dos vírus na origem e evolução dos seus hospedeiros é algo notável, desde a emergência de organismos complexos como os mamíferos placentários, até a evolução de seres mais basais, como protozoários e algas unicelulares que possuem vírus gigantes integrados em seus genomas, moldando diretamente a sua história evolutiva (MI *et al.*, 2000; MONIRUZZAMAN *et al.*, 2020; BELLAS *et al.*, 2023).

1.2. Vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA

Os vírus grandes nucleocitoplasmáticos de DNA possuem características ímpares. O gigantismo de suas partículas virais e seus genomas complexos chamam a atenção da comunidade científica, desafiando a própria definição de vírus, lançando uma nova luz sobre o debate a respeito de seu possível papel na evolução dos domínios celulares (GUGLIEMINI *et al.*, 2019). O filo *Nucleocytoviricota* (NCLDV) é composto por vírus grandes de DNA de dupla fita dos mais diversos tamanhos, podendo atingir até mais de 2 µm em extensão de suas partículas (AYLWARD *et al.*, 2021; AYLWARD *et al.*, 2023). Os NCLDV, de maneira geral, apresentam os mais variados tamanhos de genomas, indo desde 100 kbp chegando a tamanhos maiores que 2.5 Mbp. O genoma dos membros do filo *Nucleocytoviricota* é altamente complexo e quimérico, o que significa que seus genes parecem ter sido adquiridos de diversas outras entidades biológicas, incluindo outros vírus e organismos celulares (AYLWARD *et al.*, 2021; VAN ETTEN *et al.*, 2020). Apesar de ser um grupo diverso, estudos sugerem que os NCLDV possuem uma origem comum (RODRIGUES *et al.*, 2021a; KOONIN *et al.*, 2018; GUGLIELMINI *et al.*, 2019). Este filo inclui atualmente duas classes, cinco ordens, 11 famílias e 54 gêneros, sendo as onze famílias *Asfarviridae*, *Ascoviridae*, *Iridoviridae*, *Poxviridae*, *Marseilleviridae*, *Mimiviridae*, *Allomimiviridae*, *Mesomimiviridae*, *Schizomimiviridae*, *Mamonoviridae* e *Phycodnaviridae* (AYLWARD *et al.*, 2021, 2023). No entanto, um estudo de 2021 de Aylward e colaboradores trouxe análises filogenéticas robustas baseadas num conjunto de sete genes marcadores concatenados. Este estudo mostrou que o filo poderia ser dividido em 6 ordens, 32 famílias e 344 gêneros, o que expande substancialmente o número de táxons atualmente reconhecidas para esses vírus (**Figura 1**).

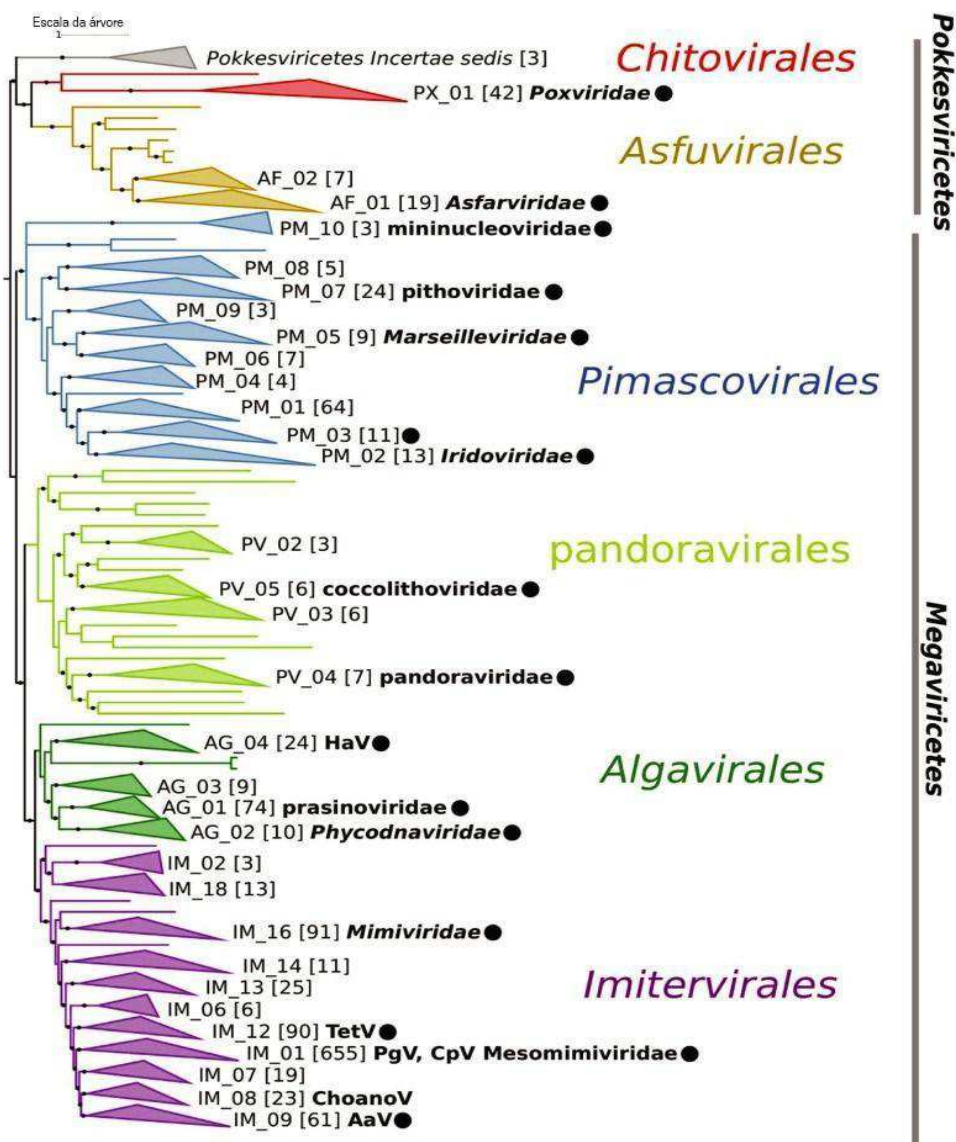


Figura 1 – Filogenia do filo *Nucleocytoviricota*. Filogenia do filo tendo como base um conjunto de 7 genes marcadores, na qual é possível observar 32 famílias. Fonte: AYLWARD *et al.*, 2021, adaptado pela autora.

1.3. Vírus que infectam algas do gênero *Chlorella*

O gênero *Chlorella* abrange microalgas verdes, pequenas, unicelulares, sem motilidade e que se reproduzem de maneira assexuada. As espécies deste gênero costumam ser de vida livre, no entanto, algumas espécies têm relações simbióticas com diferentes organismos. As zooclorelas, por exemplo, vivem associadas ao protozoário *Paramecium bursaria*, ao celenterado *Hydrozoa viridis*, e ao heliozoário *Ancanthocystis turfacea*. E são estas zooclorelas as hospedeiras dos chlorovírus, vírus que infectam algas do gênero *Chlorella* e *Chlorella-like*, os quais são vírus grandes de DNA de fita dupla (dsDNA) (WILSON *et al.*,

2010; RODRIGUES, *et al* 2022). Acreditava-se que estes chlorovírus eram os únicos vírus capazes de infectar algas do gênero *Chlorella*, no entanto, um trabalho publicado em 2022 por Sheng e colaboradores apresentou o isolamento de um novo vírus capaz de infectar clorelas de vida livre, o Chlorella Vírus XW01, o qual surpreendentemente encontra-se alocado na família *Mimiviridae*, na qual encontramos majoritariamente vírus gigantes que infectam amebas. Curiosamente, este vírus grande, assim como outros mimivírus (mamavírus, por exemplo) faz parte de um sistema tripartite, no qual a relação vírus-hospedeiro é acompanhada terceiro membro, um virofago, neste caso, o Chlorella Vírus Virophage SW01 (SHENG *et al.*, 2022).

1.3.1. O gênero *Chlorovirus*

Na família *Phycodnaviridae* encontramos vírus com genomas grandes (160 a 450 kbp) contendo centenas de sequências codificadoras de genes (CDS), podendo chegar até aproximadamente 550 CDS, além de diversos genes que codificam tRNAs. Este é um grupo diverso tanto em termos de morfologia quanto de genética. Os vírus desta família vírus são grandes (120–220 nm de diâmetro) e podem ser encontrados nos mais diversos ambientes aquáticos infectando algas (marinhas e de água doce). Dos seis gêneros de *Phycodnaviridae* atualmente reconhecidos pelo Comitê Internacional de Taxonomia Viral (ICTV, em inglês), o mais estudado é o *Chlorovirus* (VAN ETTEN *et al.*, 2020).

Os chlorovírus são vírus grandes de simetria icosaédrica, formadores de grandes placas de lise (**Figura 2**). Estes vírus existem em regiões de água doce, e acredita-se que estão presentes em todo o mundo, com isolados em diferentes regiões do planeta, alcançando títulos estimados que passam de mil unidades formadoras de placas por mL (VAN ETTEN e DUNIGAN, 2012). Os vírus deste gênero possuem grandes e complexos genomas de dsDNA. Estes genomas são lineares e variam de 290 kbp a 370 kbp, contendo de 315 a 415 CDS, das quais cerca de 50% não têm função conhecida. Algumas destas CDS inclusive são únicas na natureza, sendo observadas pela primeira vez nos chlorovírus (VAN ETTEN *et al.*, 2020; VAN ETTEN *et al.*, 2021; OLIVEIRA *et al.*, 2022). O pan-genoma dos chlorovírus, construído baseado em 36 isolados associados a difentes hospedeiros, consiste em 1.345 grupos de genes ortólogos (COGs), dos quais 368 são encontradas apenas em vírus que infectam exclusivamente algas *Chlorella variabilis* NC64A, 268 apenas em vírus de *Chlorella heliozoae* SAG e 265 são exclusivas de vírus que infectam *Micractinuum conductrix* Pbi. De todos os COGs de chlorovírus, dois terços não têm função conhecida. A prospecção, isolamento e caracterização de chlorovírus em novos locais, pode expandir ainda mais o

pan-genoma destes vírus, podendo ser, dessa forma, fonte valiosa de diversidade genética e inovação biotecnológica (RODRIGUES *et al.*, 2022).

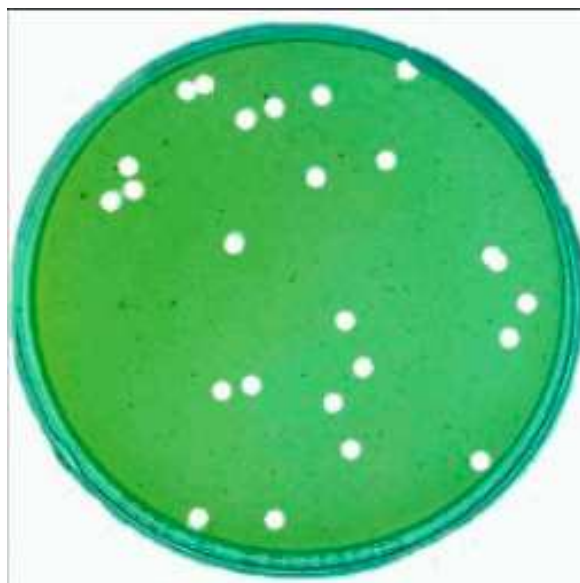


Figura 2 – Placas de lise formadas pelo PBCV-1. Placas de lise causadas pelo vírus PBCV-1, em um tapete de *C. variabilis*. Fonte: VAN ETTEN e DUNIGAN, 2011.

Os chlorovírus apresentam um alto tropismo pelas células das clorélas, e isto parece estar relacionado com a interação do vírus com a parede celular do hospedeiro, sugerindo um alto grau de especificidade na interação vírus-hospedeiro. A filogenia dos chlorovírus revela que estes estão distribuídos em três diferentes clados: dos SAG vírus, Pbi vírus e dos NC64A vírus. Os vírus que infectam uma mesma espécie hospedeira são também pertencentes ao mesmo clado, portanto, os chlorovírus isolados de algas *Chlorella variabilis* NC64A são os chamados vírus NC64A; os que infectam *Chlorella heliozoae* SAG 3.83 são os vírus SAG, e os vírus Pbi infectam a alga *Chlorella-like Micractinium conductrix* Pbi. O chlorovírus que infecta *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 está alocado no clado dos NC64A vírus, conforme podemos observar na **Figura 3**, na qual uma espécie de chlorovírus que infecta Syngen 2-3 (OSy-NE5) está indicada em vermelho, estando entre os subclados dos vírus NC64A (um subclado contém o vírus *Paramecium bursaria Chlorella Virus-1* (PBCV-1), enquanto o outro subclado contém o chlorovírus NY-2A). Este vírus é denominado de OSy vírus, pois se replica exclusivamente em *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 (VAN ETTEN *et al.*, 2020; QUISPE *et al.*, 2017).

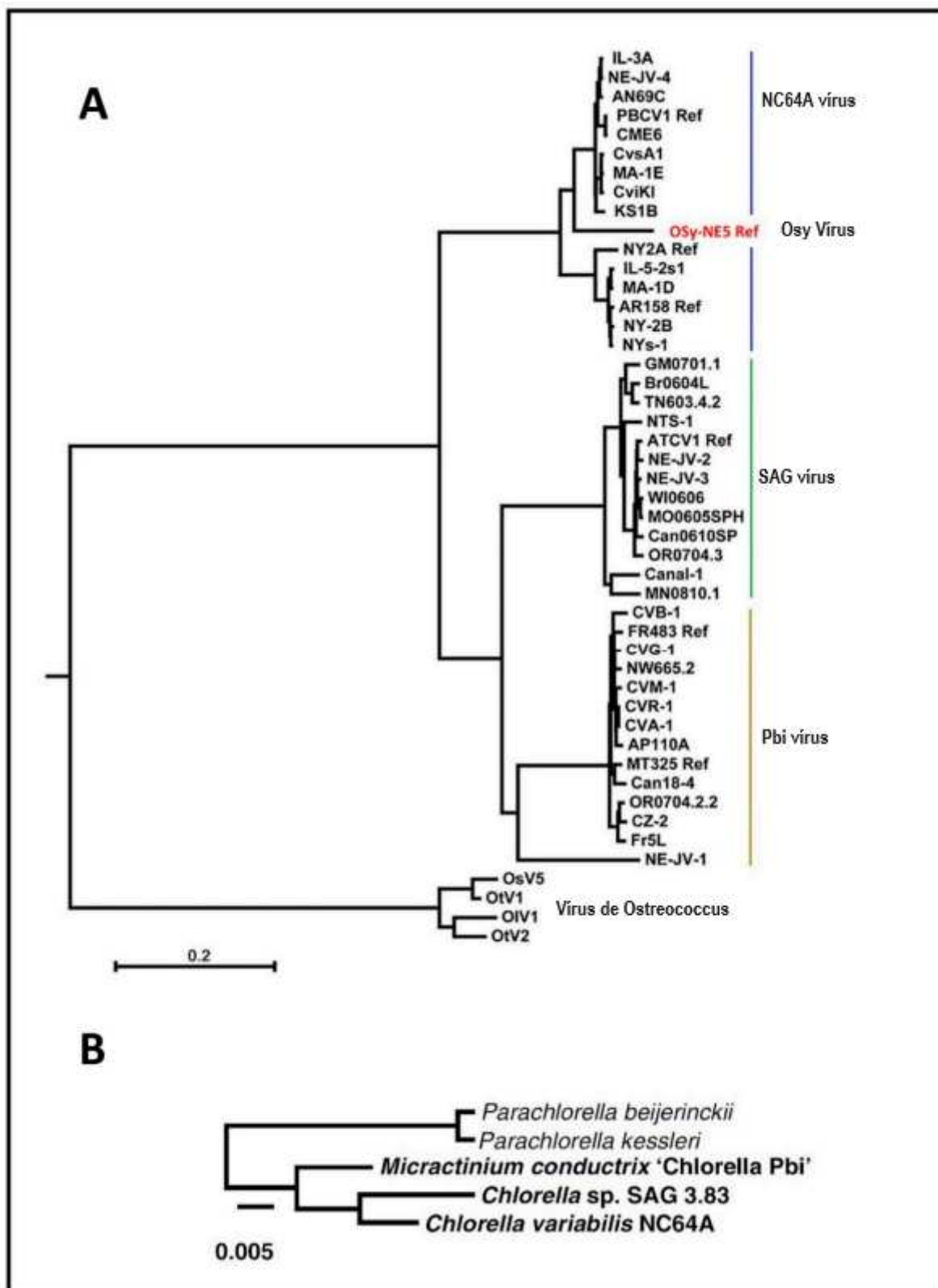


Figura 3 – Filogenias dos chlorovírus e das algas hospedeiras. No painel A: árvore filogenética que mostra as relações evolutivas entre 47 sequências de aminoácidos concatenadas obtidas a partir de predições gênicas dos genomas de chlorovírus; No painel B: Árvore de máxima verossimilhança de três algas hospedeiras com base no alinhamento do RNA 18S. Fonte: O painel A é de QUISPE *et al.* 2017 e o painel B é de JEANNIARD *et al.*

2013; a imagem com os dois painéis é de VAN ETEN *et al.*, 2020, adaptado pela autora.

1.3.2. Estrutura da partícula viral dos chlorovírus

O *Paramecium bursaria chlorella virus* (PBCV-1) é a espécie “modelo” de estudo do gênero dos *Chlorovirus*. Este vírus infecta algas *Chlorella variabilis* e sua partícula viral servirá como modelo para ilustrar a estrutura dos demais chlorovírus. No capsídeo do PBCV-1, as proteínas estruturais se organizam em arranjos hexaméricos os quais formam estruturas triangulares (trissímetrons) e pentaméricas (pentassímetrons), as quais possuem um pentâmero em cada um dos 12 vértices (**Figura 4**) (FANG et al., 2019; SHAO et al., 2022). Cada trissímetron contém 66 capsômeros e cada pentassímetron possui 31 capsômeros (30 capsômeros pseudo-hexaméricos e um capsômero pentamérico). Estes capsômeros são unidos por uma rede de proteínas secundárias do capsídeo (FANG et al., 2019). A proteína principal do capsídeo do PBCV-1, Vp54, é uma proteína glicosilada em pelo menos 6 sítios, e é capaz de se complexar com outras unidades de Vp54 e com as proteínas secundárias do capsídeo (SPECIALE et al., 2022). Diversos outros vírus também têm suas proteínas estruturais glicosiladas, tais como rabdovírus, poxvírus e paramyxovírus. No caso destes, a glicosilação é feita inteiramente pela maquinaria do hospedeiro. Os chlorovírus, entretanto, codificam a maioria, senão todas, as proteínas envolvidas na glicosilação da proteína principal do capsídeo (SPECIALE et al., 2020). Em um dos vértices, é possível visualizar uma espícula (conforme é possível ver na **Figura 4**) na qual são encontradas proteínas importantes para o ciclo de multiplicação viral. A partícula viral é formada (em termos de massa) por cerca de 65% de proteínas, de 5 a 10% de lipídios (associados à bicamada lipídica que forma uma membrana a qual fica localizada abaixo do capsídeo de glicoproteínas), e cerca de 25% de DNA. Existe na partícula também um bolsão, que consiste em um espaço no qual estão localizadas proteínas responsáveis por degradar a parede celular do hospedeiro (**Figura 4**) (VAN ETTEN et al., 2020).

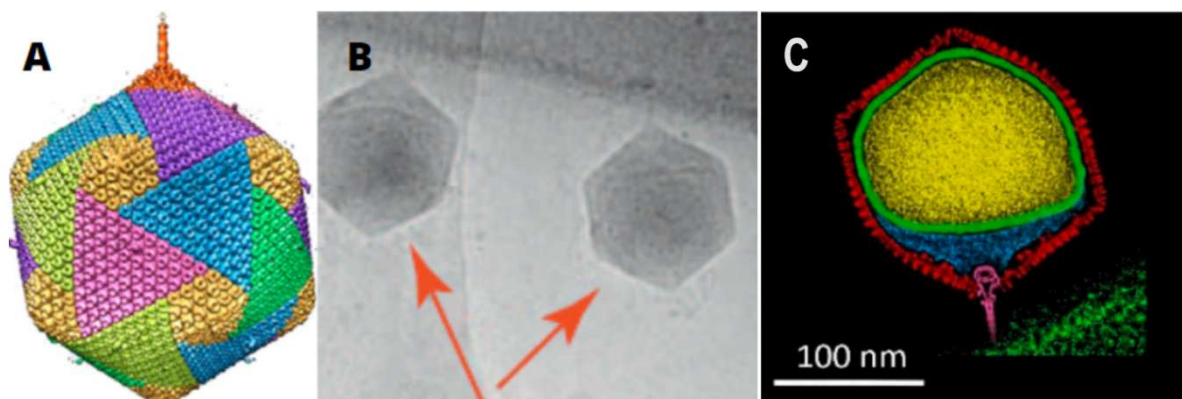


Figura 4 – Representações da partícula viral do PBCV-1. A imagem A mostra a reconstrução 3D da partícula

viral baseada em análises estruturais por microscopia eletrônica, podemos ver destacado na cor alaranjada a espícula, em amarelo, os pentassímetros, e os demais triângulos coloridos são os trissímetros. A imagem B mostra uma micrografia da partícula viral obtida por microscopia eletrônica. Na imagem C: micrografia da partícula viral de PBCV-1 colorida digitalmente, em amarelo o genoma viral, em verde a membrana interna, em azul o bolsão, em rosa a espícula e em vermelho o capsídeo do vírus. Fonte: VAN ETTEN *et al.*, 2020; VAN ETTEN e DUNIGAN, 2012.

1.3.3. Ciclo de multiplicação dos chlorovírus

O ciclo de multiplicação do PBCV-1 inicia-se quando a partícula se adere de maneira irreversível à parede celular da alga. Acredita-se que esta ligação ocorra por meio de proteínas localizadas na espícula, as quais parecem ser específicas para o receptor celular (o que define o espectro de hospedeiros). A proteína viral Vp130 do chlorovírus CVK2 (e que é conservada entre os vírus NC64A), por exemplo, se liga especificamente à parede celular da *Chlorella* hospedeira (YAMADA *et al.*, 2006). A adesão do vírus à célula promove alterações na estrutura da partícula, de forma que as enzimas que realizam a degradação da parede celular são liberadas e realizam a digestão desta. Após esta etapa, a membrana interna do vírion se funde à membrana celular, restando apenas um capsídeo vazio (VAN ETTEN e DUNIGAN, 2012). O DNA do vírus vai rapidamente para o núcleo e é prontamente transcrito, gerando mRNAs precoces, os quais serão traduzidos pelos ribossomos, gerando proteínas de fase precoce, as quais participam da replicação do DNA. O DNA recém sintetizado é transcrito para gerar mRNAs tardios (os quais serão traduzidos a proteínas tardias, que são proteínas estruturais e outras proteínas importantes para o início do próximo ciclo, por exemplo, as proteínas que degradam a parede celular), e algumas outras cópias desse DNA recém sintetizado serão direcionadas ao centro de montagem viral, para serem posteriormente encapsidados junto às proteínas tardias (VAN ETTEN e DUNIGAN., 2012). Após a etapa de montagem que ocorre no centro de montagem, a progênie viral se acumula no citoplasma, a parede celular e membrana celular da alga são lisadas, e os vírions maduros serão liberados. Cada alga infectada libera mais de mil partículas virais, no entanto, estima-se que apenas cerca de 25% destas serão formadoras de placas, ou seja, partículas virais infecciosas (VAN ETTEN *et al.*, 2020). A **Figura 5** ilustra o ciclo de multiplicação do PBCV-1.

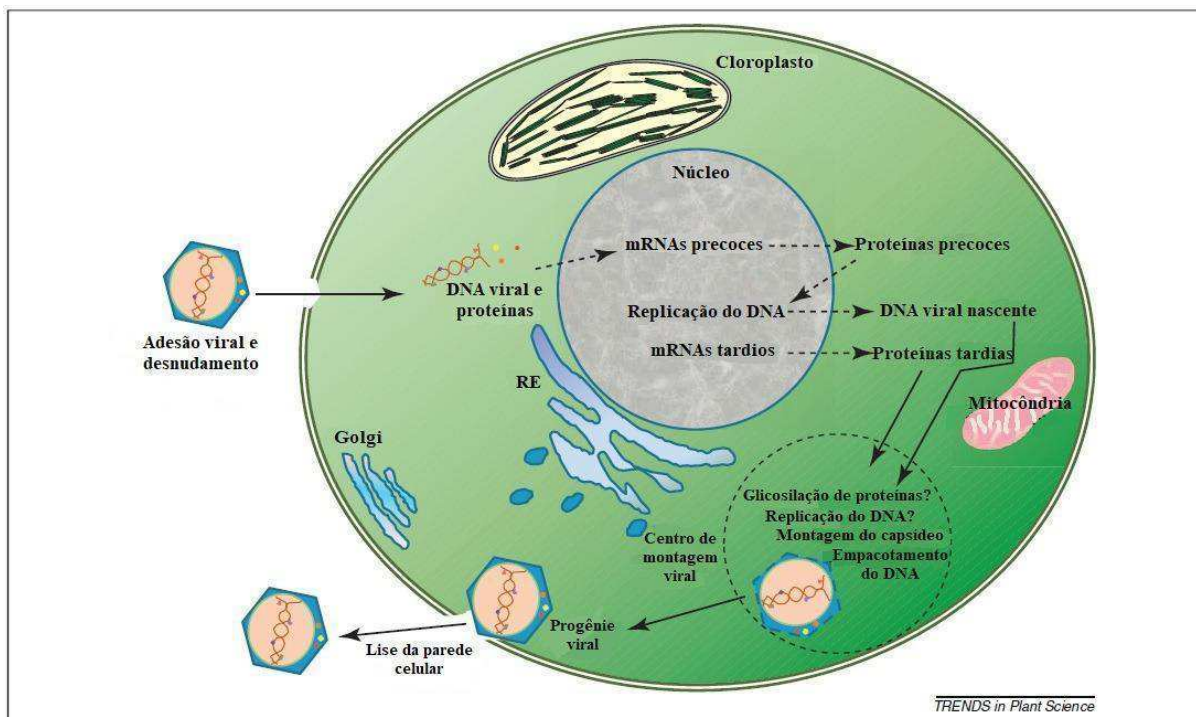


Figura 5 – Ciclo de multiplicação do PBCV-1. Esquema representativo do ciclo de multiplicação do PBCV-1, um vírus nucleocitoplasmático. Fonte: VAN ETEN e DUNIGAN, 2012, adaptado pela autora.

É importante ressaltar, também, que as etapas iniciais – perfuração da parede celular do hospedeiro, geração de um túnel de membrana e a projeção do material genético viral para dentro da célula hospedeira, restando apenas um capsídeo vazio– e finais –liberação dos vírus após a lise celular– do ciclo de multiplicação destes vírus, assim como sua estrutura –capsídeo icosaédrico com uma espícula–, possuem maior semelhança com o ciclo replicativo de bacteriófagos do que com o ciclo de outros vírus que infectam eucariotos (**Figura 6**). Por este motivo, diversas técnicas empregadas para isolar e caracterizar chlorovírus são adaptadas de métodos utilizados tradicionalmente com bacteriófagos (MILROT *et al.*, 2017).

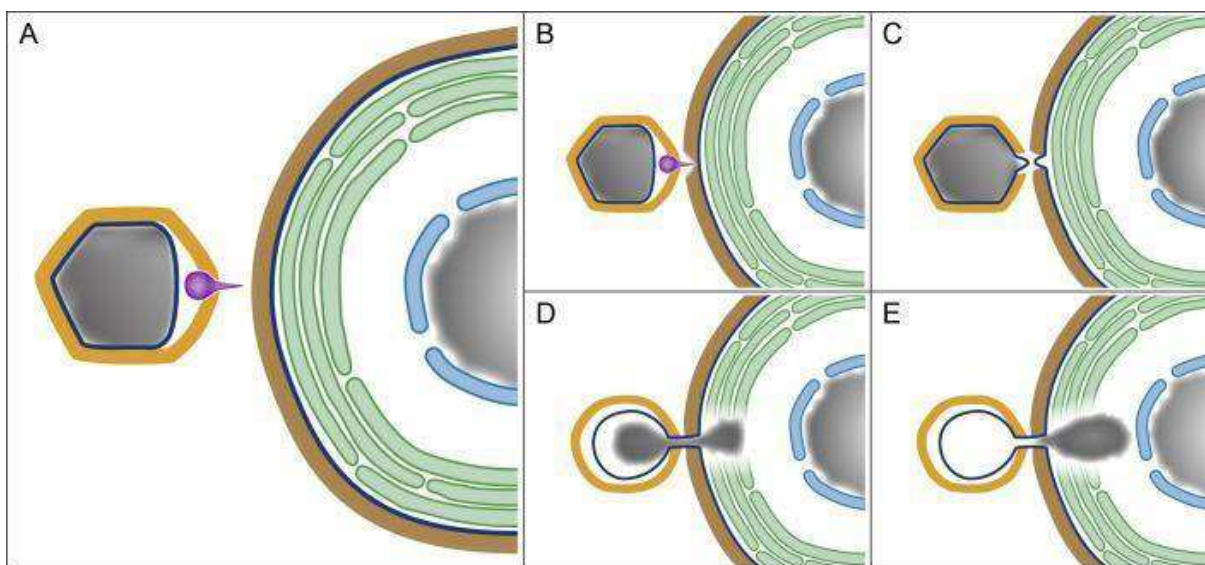


Figura 6 – Representação do início do ciclo de multiplicação do PBCV-1. Na figura 6 temos em: A. Representação das estruturas virais e celulares, em amarelo, o capsídeo icosaédrico do PBCV-1, em azul escuro dentro da partícula viral, a membrana interna do vírus, colorido de cinza seu genoma, e colorido de roxo, a espícula. A parede celular está representada pela cor marrom e a membrana celular, azul escuro, as pilhas de tilacóides, verdes. B-D. Perfuração da parede celular do hospedeiro mediada pela espícula, fusão das membranas internas, viral e celular, em um túnel de membrana. D, E. Internalização do genoma do PBCV-1 no citoplasma do hospedeiro por meio do túnel, acompanhada pela perfuração das pilhas de tilacóides fotossintéticos. Fonte: MILROT *et al.*, 2017.

1.3.4. Potencial biotecnológico das enzimas de chlorovírus

Os vírus não possuem diversas características essenciais para os demais organismos vivos. Eles geralmente não apresentam maquinaria metabólica para produção de energia nem para síntese de macromoléculas. A descoberta dos *Nucleocytoviricota*, no entanto, mudou completamente este paradigma, uma vez que neste filo foram encontrados genes que codificam enzimas responsáveis por sintetizar macromoléculas, algo inédito para a virologia (BELHAOUARI *et al.*, 2022). Apesar de não serem capazes de se multiplicar sem a presença do hospedeiro, estes vírus apresentam diversos genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo energético e, como mencionado, na síntese de macromoléculas (SPECIALE *et al.*, 2022). Os chlorovírus foram os primeiros vírus nos quais foram identificadas proteínas sintetizadoras de açúcares (como a UDP-glicose-4,6-deidratase), além de enzimas sintetizadoras de quitina, hialuronano (como a hialuronano sintase) e enzimas envolvidas na síntese de glicanos (SPECIALE *et al.*, 2022). No genoma do PBCV-1, por exemplo, são encontradas glicosiltransferases, GDP-d-manose desidratase (GMD) e

GDP-4-ceto-6-desoxi-manose epimerase/reductase (GMER), as quais são enzimas envolvidas no processo de glicosilação, sintetizando os resíduos de açúcar que constituem a proteína principal do capsídeo Vp54 (TONETTI *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2022; GRAVES *et al.*, 2001; SPECIALE *et al.*, 2019). Isso faz destes vírus entidades únicas, incomuns e de grande potencial biotecnológico, pois são vírus que possuem genes que codificam enzimas envolvidas no metabolismo de açúcar e diversas outras CDSs que codificam proteínas hipotéticas completamente diferentes das proteínas que conhecemos até então. Cerca de 50% das CDSs dos chlorovírus são inéditas, alguns chlorovírus possuem inclusive íntrons em seus genomas, fazendo destas entidades biológicas realmente intrigantes e possivelmente promissoras para aplicações biotecnológicas (VAN ETTEN e DUNIGAN, 2012). Certas enzimas do PBCV-1, modelo de estudos do gênero *Chlorovirus*, já são, inclusive, comercializadas pela *New England BioLabs Inc*®, o que evidencia o grande potencial que a exploração das demais enzimas destes vírus possui. Uma das enzimas do PBCV-1 comercializadas é a DNA ligase, a qual é a menor ligase conhecida, sendo capaz de ligar uma molécula de DNA a uma de RNA com uma alta eficiência (LOHMAN *et al.*, 2014). Outra enzima deste vírus comercializada, é a endonuclease CvIAII, a qual cliva o DNA em um sítio específico, e mesmo se este estiver metilado, sua atividade não é afetada (ZHANG *et al.*, 1992). Isto demonstra a importância de seguir com estudos de prospecção e caracterização biológica e genômica destes vírus, especialmente em locais ainda inexplorados, uma vez que temos o potencial de encontrar novos vírus, com novos genes, o que abrirá portas para inovações tecnológicas.

1.3.5. Alterações morfológicas causadas pelos chlorovírus

Para compreender as alterações morfológicas causadas nas células de *Chlorella variabilis* pela infecção causada pelos chlorovírus, serão usados como exemplo o vírus OSy-NE5 e sua alga hospedeira *Chlorella variabilis* Syngen 2-3. A primeira evidência morfológica da infecção por OSy-NE5 pode ser observada em 1h pós-infecção, quando o núcleo da alga perde sua forma esférica, assumindo uma morfologia alongada ou em forma de meia-lua, e o nucléolo é desintegrado. Ocorre também uma condensação da cromatina, deixando algumas áreas do núcleo vazias. Além disso, é possível observar os componentes citoplasmáticos pressionados contra o cloroplasto, resultando no aumento da área citoplasmática. Algo semelhante é observado também nas *Chlorellas variabilis* NC64A (ESMAEL *et al.*, 2023). Na terceira hora pós-infecção, é possível observar os capsídeos do

OSy-NE5 reunidos em centros de montagem no citoplasma, e as células com partículas virais opacas, bem como alguns capsídeos vazios. Às 6 horas pós-infecção, é possível observar o citoplasma repleto de partículas virais maduras (ESMAEL *et al.*, 2023).

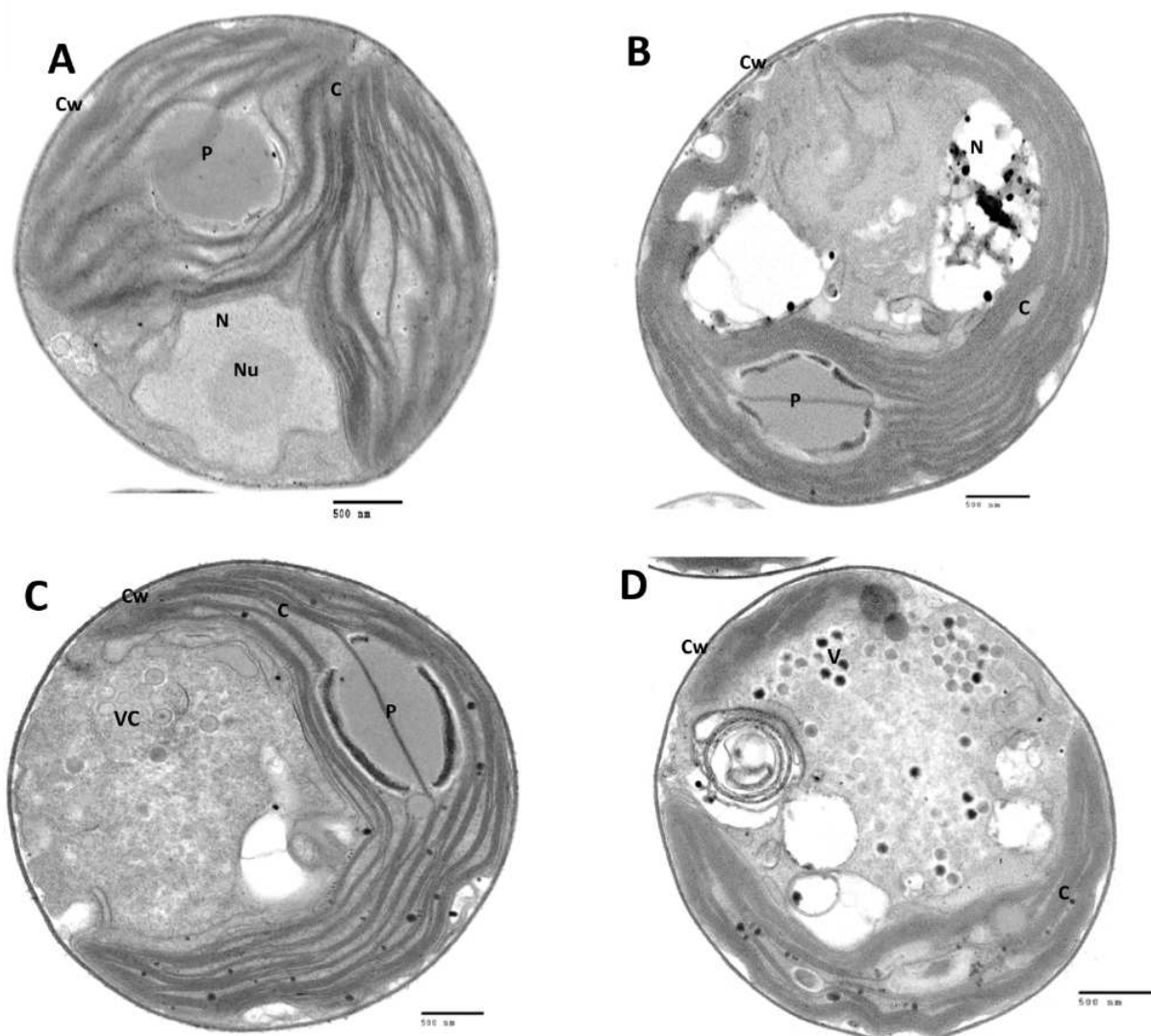


Figura 7 – Micrografias eletrônicas de transmissão de *C. variabilis* Syngen 2-3 infectada e não infectada pelo OSy-NE5. Em A: célula Syngen 2-3 não infectada, em B-D: 1 h, 3 h e 6 h pós-infecção pelo vírus Os-NE5. C- cloroplasto, P-pirenóide, N- núcleo, Nu- nucléolo, Cw- parede celular, VC- centro de montagem do vírus, e V- partículas de vírus. Barras de escala: 500 nm. Fonte: ESMAEL *et al.*, 2023.

1.3.6. Um novo vírus capaz de infectar clorélas de vida livre

Em 2022, um trabalho de Sheng e colaboradores identificou de forma inédita um novo vírus capaz de infectar clorélas de vida livre, um vírus grande de alga verde CV-XW01, o qual curiosamente, é filogeneticamente mais próximo do vírus gigante Cafeteria roenbergensis

vírus (família *Mimiviridae*), do que de outros chlorovírus (família *Phycodnaviridae*). Este novo vírus isolado encontra-se alocado na família *Mimiviridae* junto aos vírus gigantes que infectam amebas (**Figura 7**) (SHENG *et al.*, 2022). Neste trabalho também foi identificado um novo sistema tripartite, no qual a relação *Chlorella* hospedeira-CV-XW01 é acompanhada por um outro membro: o virofago CVv-SW01 (SHENG *et al.*, 2022). Apesar da existência de trabalhos anteriores cujas evidências sugeriam a existência de sistemas tripartite envolvendo algas verdes e phycodnavírus (XU *et al.*, 2020; GONG *et al.*, 2016), até 2022 os únicos hospedeiros nos quais haviam sido isolados virófagos eram protistas, majoritariamente amebas de vida livre (QUEIROZ *et al.*, 2024). O trabalho de Sheng e colaboradores (2022), dessa forma, representou uma quebra de paradigma, mostrando um sistema tripartite presente em uma alga verde. Tais descobertas fornecem uma nova percepção sobre a diversidade de vírus grandes/gigantes e seus virófagos (SHENG *et al.*, 2022).

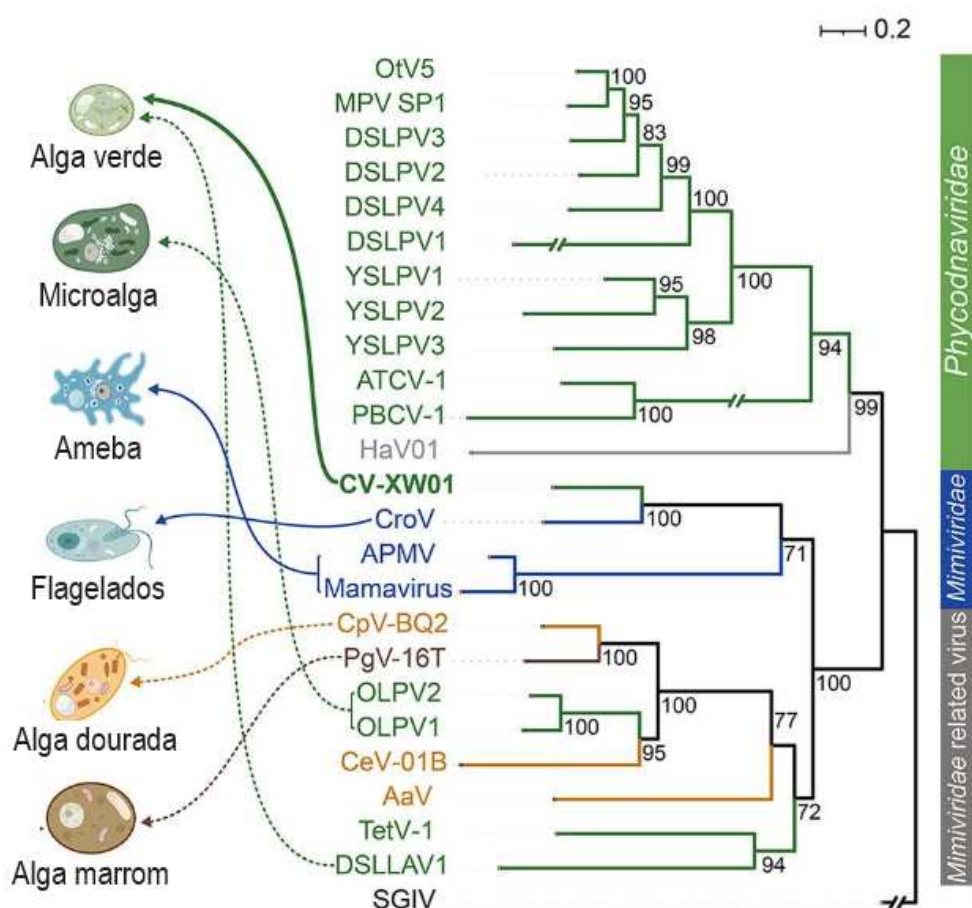


Figura 8 – Árvore filogenética do Chlorella vírus XW01 (CV-XW01). Árvore filogenética construída com base em quatro genes conservados: DNA polimerase B (PolB), A18 helicase, ATPase e proteína quinase serina/treonina (STPK). OtV, *Ostreococcus tauri* vírus; MpV, *Micromonas pusilla* vírus; DSLPV, Dishui Lake phycodnavírus; YSLPV, Yellowstone lake phycodnavírus; ATCV, *Acanthocystis turfacea chlorella* vírus; PBCV, *Planktonic Bacteriophage* vírus; HaV01, *Halobacterium salinarum* vírus; CroV, *Cryptosporidium parvum* vírus; APMV, *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus; Mamavirus, *Mamavirus* vírus; CpV-BQ2, *Cryptosporidium parvum* vírus; PgV-16T, *Piscine Giant Virus* vírus; OLPV2, *Ostreococcus lucimarinus* vírus; OLPV1, *Ostreococcus lucimarinus* vírus; CeV-01B, *Chlorella* vírus; AaV, *Acanthamoeba* vírus; TetV-1, *Tetrahymena* vírus; DSLLAV1, *Dicranella* vírus; SGIV, *Syngaster* vírus.

Paramecium bursaria chlorella vírus; HaV, Heterosigma akashiwo vírus; CroV, Cafeteria roenbergensis vírus; APMV, Acanthamoeba polyphaga mimivirus; Mamavírus, Acanthamoeba castellanii mamavírus; PgV, Phaeocystis globosa vírus; OLPV, Organic Lake phycodnavírus; CeV, Chrysochromulina ericina vírus; AaV, Aureococcus anophagefferens vírus; TetV, Tetraselmis vírus; DSLAV, Dishui Lake large alga vírus; SGIV, Singapore grouper iridovírus (grupo externo). Fonte: SHENG *et al.*, 2022, adaptado pela autora.

Investigações empregando microscopia eletrônica de transmissão das partículas virais do CV-XW01, revelam partículas virais com aproximadamente 120 nm de diâmetro e possível simetria icosaédrica (**Figura 8**). Foram observadas, também, pequenas partículas (aproximadamente 50 nm de diâmetro) em forma de icosaedro, as quais foram relacionadas ao virófago CVv-SW01 (SHENG *et al.*, 2022).

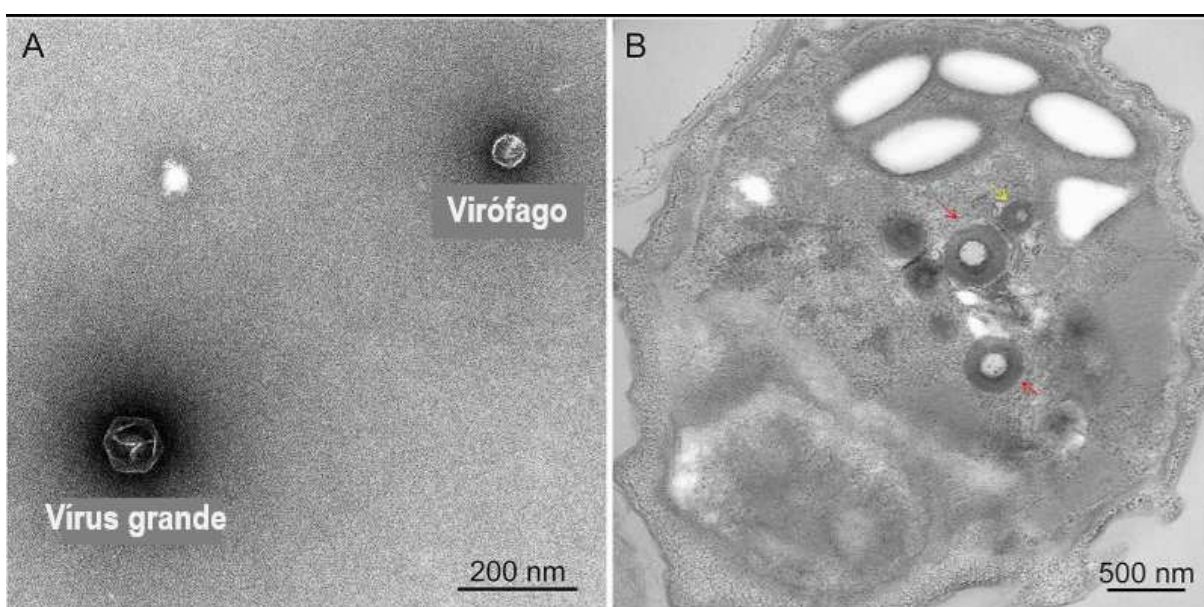


Figura 9 – Micrografias do vírus CV-XW01 e seu virófago CVv-SW01. Em A: imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão do vírus grande CV-XW01 e seu virófago CVv-SW01; Em B: o vírus CV-XW01, indicado pelas setas vermelhas e seu virófago CVv-SW01, indicado pela seta amarela, dentro da célula hospedeira. Fonte: SHENG *et al.*, 2022.

O Chlorella vírus XW01 possui um genoma de 407.612 pb, com 21,9% de conteúdo GC, e 346 ORFs (*Open Reading Frames*), das quais 42,5% são ORFans (ORFs sem homologia detectável com outras ORFs em um banco de dados). Entre as demais ORFs, 70,4% estão relacionadas a proteínas de vírus gigantes/grandes, e 12,1% compartilham semelhança com proteínas eucarióticas. Três ORFs são homólogas a proteínas de algas verdes (*Chlorophyta*). Foram encontradas 140 ORFs relacionadas a proteínas de vírus gigantes/grandes. Destas, 134 possuem similaridade com proteínas de vírus da família *Mimiviridae* e outras famílias da ordem *Imitervirales* (SHENG *et al.*, 2022).

1.3.7. Os hospedeiros: Algas do gênero *Chlorella*

Chlorella é um gênero de algas verdes cujas espécies se reproduzem de forma não sexuada, na qual as células vegetativas não móveis (autósporos) aumentam em tamanho e se dividem em duas, quatro, oito ou mais células, as quais são liberadas após a ruptura ou digestão enzimática da parede celular da célula parental, e rapidamente se tornam, também, células vegetativas (WILSON *et al.*, 2010; VAN ETTEN *et al.*, 2020). A quantidade de células filhas geradas depende de fatores ambientais e também da espécie de *Chlorella*. A reprodução dessas algas ocorre muito rapidamente. Em 24 horas, uma célula de *C. vulgaris*, por exemplo, se multiplica por autoesporulação (SAFI *et al.*, 2014). As algas deste gênero são pequenas e esféricas ou elipsoidais, podendo ter de 2-10 micrômetros de diâmetro (SAFI *et al.*, 2014).

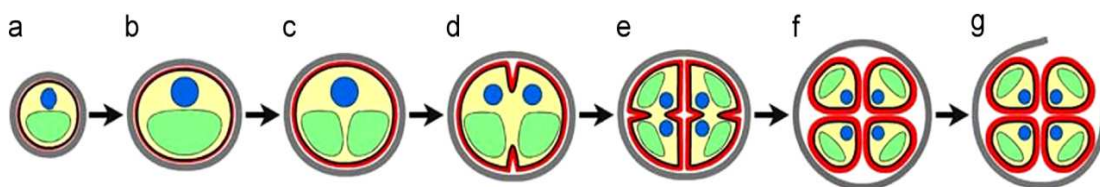


Figura 10 – Esquema representando a reprodução assexuada das *Chlorellas*. Representação das diferentes fases da formação das células filhas: a-fase inicial de crescimento celular; b-fase final de crescimento celular; c-fase de divisão do cloroplasto; d-fase inicial de divisão do protoplasto; e-fase final de divisão do protoplasto; f-fase de maturação das células filhas e g-fase de eclosão. Fonte: SAFI *et al.*, 2014

As células de *C. vulgaris* podem apresentar-se como autotróficas, no qual a fotossíntese gerará energia para a célula; heterotróficas, no qual a ingestão de materiais orgânicos, sobretudo a glicose, servirá como fonte de energia; e a célula pode, também, apresentar-se como mixotrófica, na qual pode usar a fotossíntese e a glicose para obtenção de energia. Portanto, as células não dependem estritamente de luz ou substrato orgânico para crescer (SAFI *et al.*, 2014).

Nas células de *Chlorella vulgaris*, uma *Chlorella* de vida livre, podemos observar no citoplasma mitocôndrias, um pequeno núcleo, vacúolos, um único cloroplasto e o complexo de Golgi. Além disso, possuem membrana plasmática e externa a ela, parede celular (**Figura 10**). A *C. vulgaris* tem um único cloroplasto com uma membrana dupla composta de fosfolípidios. A membrana externa é permeável a metabólitos e íons, enquanto a membrana interna tem uma função no transporte de proteínas. No cloroplasto encontramos grânulos de amido, compostos de amilose e amilopectina, os quais podem ser formados especialmente sob

condições de crescimento desfavoráveis, e o pirenóide, o qual é o centro de fixação de dióxido de carbono. O cloroplasto também contém um conjunto de tilacóides fundidos onde o pigmento dominante, a clorofila, é sintetizado (SAFI *et al.*, 2014).

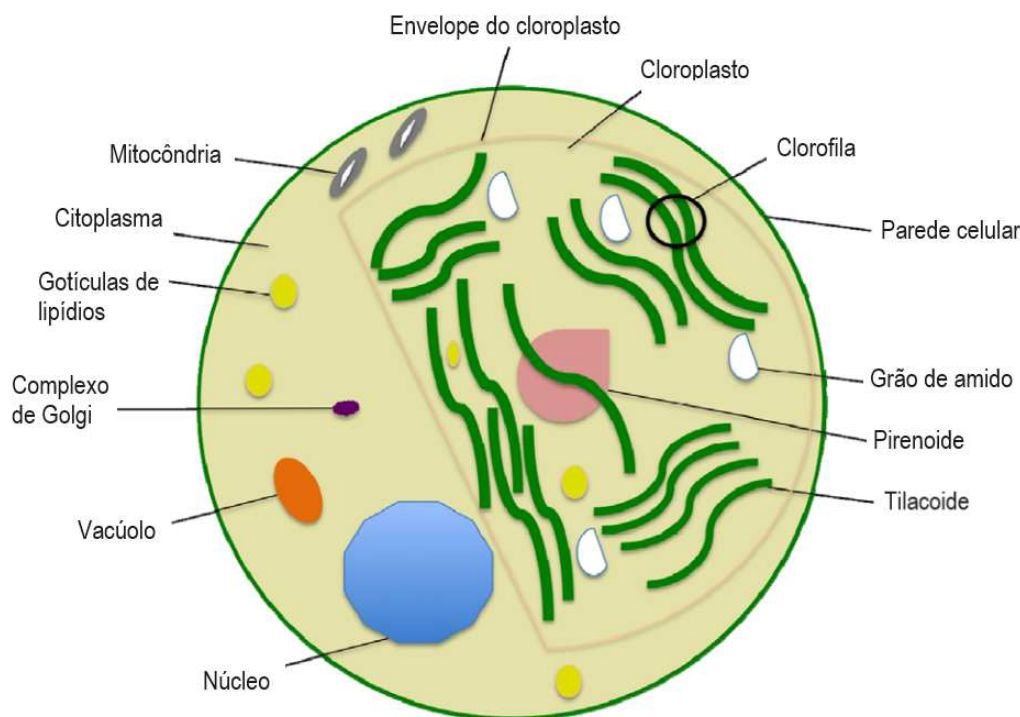


Figura 11 – Esquema representando a ultraestrutura da *C. vulgaris*. Representação destacando as organelas e estruturas celulares de uma célula de *C. vulgaris*. Fonte: SAFI *et al.*, 2014, adaptado pela autora.

A maior parte das clorélas são de vida livre, ou seja, apenas algumas espécies vivem como endossimbiontes associadas ao protozoário *Paramecium bursaria*, ao celenterado *Hydra viridis* ou ao radiolário *Acanthocystis turfacea*. São estas endossimbiontes, as *zoochlorellae*, que os chlorovírus infectam. (VAN ETTEN e DUNIGAN, 2012; VAN ETTEN *et al.*, 2020). Elas vivem em vacúolos nos protozoários os quais as protegem não só das enzimas do hospedeiro, mas também dos vírus, enquanto a alga realiza fotossíntese e fornece açúcares ao protozoário (HORAS *et al.*, 2022). A endossimbiose é facultativa, de forma que ambas as espécies conseguem também crescer de forma independente, ou seja, o cultivo destas algas unicelulares em laboratório é possibilitado, permitindo a realização de ensaios de placa e estudo do ciclo de multiplicação dos chlorovírus (VAN ETTEN *et al.*, 2020). Quatro dessas zooclorelas têm sido usadas como plataformas para isolamento de chlorovírus: *Chlorella variabilis* NC64A, *Chlorella variabilis* Syngen 2-3, *Chlorella heliozoae* SAG 3.83 e a alga *Chlorella-like Micractinium conductrix* Pbi (VAN ETTEN *et al.*, 2020). É importante ressaltar que, conforme mencionado, nem todas as algas unicelulares do gênero *Chlorella*

vivem como endossimbiontes, sendo também possível isolar vírus a partir destas de vida livre, como mostrado no trabalho de Sheng e colaboradores (2022).

1.4. Vírus que infectam cianobactérias

Cianófagos são vírus que infectam cianobactérias e foram descritos na literatura pela primeira vez em 1963. São importantes reguladores da abundância e composição das cianobactérias, tanto em termos de espécies quanto de cepas, podendo favorecer, por exemplo, a prevalência de cianobactérias não produtoras de toxinas em detrimento das produtoras (GRASSO *et al.*, 2022).

Apesar de todos os fagos que infectam cianobactérias descritos até então apresentarem como material genético DNA de dupla fita, tal grupo não é de forma alguma homogêneo, ou seja, há uma grande diversidade em termos de estrutura, habitat, genes e espectro de hospedeiros. Tais fagos eram distribuídos classicamente em famílias virais, e esta divisão era feita baseada em características morfológicas (GRASSO *et al.*, 2022). Eram elas: *Myoviridae* (fagos que possuem cauda contrátil), *Siphoviridae* (cauda longa não contrátil) e *Podoviridae* (cauda curta não contrátil) (NAKNAEN *et al.*, 2021). No entanto, em 2021 o *Taxonomy release* do ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*), já não contava mais com estas famílias, uma vez que o comitê têm evitado realizar classificações taxonômicas tendo como base características morfológicas dos vírus (GRASSO *et al.*, 2022).

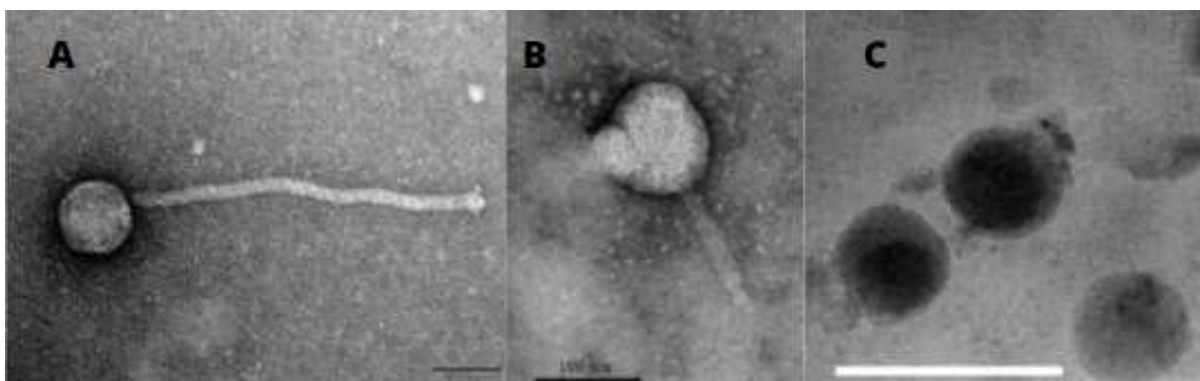


Figura 12 – Micrografias de diferentes cianófagos. Três diferentes cianófagos: (A) o MinS1, da antiga família *Siphoviridae* (cauda longa não contrátil); (B) o MaAM05, da antiga família *Myoviridae*, sendo fagos que possuem cauda contrátil; e (C) fago Ma-LBP, da antiga família *Podoviridae* (cauda curta não contrátil). A barra de escala na imagem A corresponde a 50 nanômetros e as demais, 100 nanômetros. Fonte: ZHANG *et al.*, 2022; NAKNAEN *et al.*, 2021; TUCKER e POLLARD, 2005.

Serão o foco deste trabalho os cianófagos capazes de infectar cianobactérias do gênero *Microcystis*. Os fagos identificados até então e suas características estão sumarizados na **Tabela 1** e os países nos quais foram isolados estão indicados na **Figura 13**.

Tabela 1 – Cianófagos que infectam *Microcystis* descritos até o momento

Cianófago	Tamanho do genoma	Número de CDS	%GC	Genbank ID	Local de onde foi isolado	Referência
Mwe-Yong1112-1	39679 bp	53	66,60%	MZ436628.1	-	CAI <i>et al.</i> , 2022
Mea-Yong924-1	40325 bp	59	48,32%	MZ447863.1	Lago Yangming, China	QIAN <i>et al.</i> , 2022
MACPNOA1	42473 bp	53	68,26%	KY697807.1	China	GU e LI, 2019
MaeS-yong1	43665 bp	51	66,70%	MT855965.1	China	YANG <i>et al.</i> , 2020b
MweS-yong2	44530 bp	61	71,62%	OM681334.1	China	WANG <i>et al.</i> , 2022b
Mae-Yong1326-1	48822 bp	53	71,80%	OP028995.1	Lago Taihu, China	WANG <i>et al.</i> , 2022
Me-ZS1	49665 bp	68	58,28%	MK069556.2	Lago próximo a Cao-guang-biao, China	LIN <i>et al.</i> , 2020
Mins1	49966 bp	71	71,67%	MZ923504.1	Córrego Mayang, China	ZHANG <i>et al.</i> , 2022
Mic-1	92627 bp	111	35,17%	MN013189.1	Lago Chaohu, China	YANG <i>et al.</i> , 2020
Ma-LMM01	162109 bp	181	45,95%	AB231700.1	Lago Mikata, Japão	YOSHIDA <i>et al.</i> , 2006
MaMV-DC	169223 bp	186	46,03%	KF356199.1	Lago Dainchi, China	OU <i>et al.</i> , 2013
MaAM05	273876 bp	263	54,22%	MW495066.1	Bacia de Tratamento de lodo do Hospital Songklanagarind, Tailândia	NAKNAEN <i>et al.</i> , 2021
Ma-LBP	-	-	-	-	Lago Baroon, Austrália	TUCKER e POLLARD, 2005

Fonte: Elaborado pela autora.



Figura 13 – Países nos quais os cianófagos de *Microcystis* já foram isolados. Mapa no qual estão destacados os países em que foram isolados cianófagos que infectam *Microcystis*. Fonte: Elaborado pela autora.

1.4.1. Cianófagos: Um grupo altamente diverso

Os fagos supracitados foram todos isolados em países do oriente, conforme mostrado no **Tabela 1** e **Figura 13**, ou seja, até o momento não foram isolados cianófagos no Brasil, o que evidencia a necessidade de se realizar trabalhos que visem prospectar tais vírus neste país. Embora todos os cianófagos tenham o formato característico da cabeça de bacteriófagos (uma cabeça isométrica), existem diversas morfologias de cauda, podendo ser: longa e complexa com uma bainha contrátil e um tubo central, separada da cabeça por um pescoço; curta (sem um pescoço), geralmente medindo menos da metade do diâmetro da cabeça; cauda não contrátil tão longa ou mais longa que o diâmetro da cabeça (GRASSO *et al.*, 2022). Vale ressaltar que os cianófagos são, conforme mencionado, um grupo muito diverso em mais de um aspecto. O fago Ma-LMM01 (*M. aeruginosa*—Lake Mikata Myoviridae 01), por exemplo, infecta apenas as cepas de *M. aeruginosa* produtoras de toxinas, ou seja, seu espectro de hospedeiros é restrito. Enquanto isso, o fago Me-ZS1 consegue infectar múltiplas espécies de até 5 ordens diferentes, ou seja, possui um amplo espectro de hospedeiros (GRASSO *et al.*, 2022). A diversidade genética também é uma característica relevante, sendo que o %GC, o número de genes, o tamanho do genoma e a topologia do DNA variam enormemente neste grupo, conforme evidenciado pelo **Tabela1**. O fago Mae-Yong924-1, por exemplo, é tão distinto dos demais que pode representar inclusive uma nova família (QIAN *et al.*, 2022). Os números de *open reading frames* (ORFs) preditas são muito variados, no entanto, quase todos os fagos apresentam ORFs únicas. O fago Mins1, por exemplo, apresentou apenas 23 das suas 75 ORFs sendo homólogas a genes com função conhecida (ZHANG *et al.*, 2022).

1.4.2. Ciclo de multiplicação dos cianófagos

Cianófagos, assim como os demais bacteriófagos, apresentam dois ciclos de multiplicação: o ciclo lítico e o lisogênico (**Figura 14**). Independente do tipo de ciclo de multiplicação, os cianófagos se replicam usando a maquinaria celular do hospedeiro. O ciclo pode ser resumido às seguintes etapas: adsorção, penetração, biossíntese, maturação e liberação (no caso do ciclo lítico) (WEINBAUER *et al.*, 2004). O ciclo lisogênico pode progredir para ciclo lítico, no qual a progênie de cianófagos maduros é liberada por meio de lise celular (via mecanismo mediado por endolisina ou holina). No ciclo lisogênico, o DNA viral se integra ao genoma da célula (por meio da própria maquinaria celular) por várias gerações produzindo profagos, um estado latente da infecção (BATINOVIC *et al.*, 2019;

WEINBAUER *et al.*, 2004). Os fagos lisogênicos são capazes de entrar no ciclo lítico a depender de alterações nas condições do ambiente celular. Se a célula hospedeira está passando por estresse, por exemplo, o fago lisogênico pode entrar rapidamente no ciclo lítico. Além disso, fatores extracelulares, tais como alterações nos níveis de nutrientes disponíveis e radiação ultravioleta também são capazes de induzir a mudança para o ciclo lítico (JASSIM e LIMOGES, 2013).

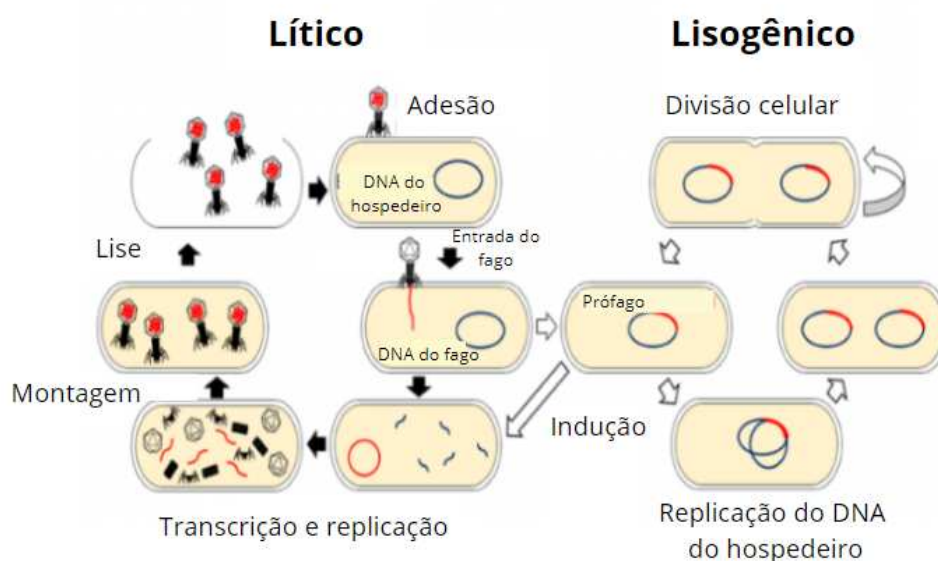


Figura 14 – Ciclo de multiplicação de cianófagos. Esquema representativo do ciclo de multiplicação de cianófagos, no qual é possível ver os ciclos lítico e lisogênico. Fonte: BATINOVIC *et al.*, 2019, adaptado pela autora.

1.4.3. O hospedeiro: Cianobactérias do gênero *Microcystis*

Microcystis é um gênero de cianobactérias que vivem em ambientes de água doce, mas que podem ser encontradas também em água salobra. O gênero é composto por cerca de 10 espécies, sendo *M. aeruginosa*, *M. botrys*, *M. flos-aquae*, *M. viridis* e *M. wesenbergii* as mais conhecidas. As cianobactérias desse gênero são as mais estudadas e mais amplamente distribuídas geograficamente entre as cianobactérias toxigênicas (CRONBERG *et al.*, 2003).

As cianobactérias do gênero *Microcystis* são unicelulares e de natureza colonial, ou seja, são capazes de formar colônias de tamanhos variáveis. Por viverem também como cianobactérias independentes, isto é, fora de colônias, estas células podem ser usadas em laboratório como plataforma de isolamento de cianófagos (GRASSO *et al.*, 2022). A cianobactéria usada neste trabalho é a mais estudada dentro do gênero: a espécie cosmopolita

M. aeruginosa. Suas células são esféricas, com cerca de 4-6 μm de diâmetro e têm muitos aerótopos (vesículas de gás), o que resulta em uma aparência granular (**Figura 15**) (CRONBERG *et al.*, 2003). Esta espécie apresenta algumas cepas produtoras de toxinas, capazes de causar eflorescências algais e apresentam grande variedade em nível intra-espécie, ou seja, são cianobactérias capazes de se adaptar bem ao ambiente em que estão (YOSHIDA-TAKASHIMA *et al.*, 2012).

As colônias de *Microcystis aeruginosa* podem ser esféricas, elipsoidais ou irregularmente lobadas podendo ter até 8 mm de diâmetro (CRONBERG *et al.*, 2003). Uma característica importante das cianobactérias que permite a formação das colônias é a capacidade de produzir exopolissacarídeos, os quais funcionam como uma “cola” nestes casos, além de funcionarem como uma barreira extra para proteção. No entanto, esta barreira não impede a adsorção dos cianófagos às células hospedeiras, pois alguns cianófagos são capazes de produzir enzimas que despolimerizam e degradam os exopolissacarídeos (GRASSO *et al.*, 2022).

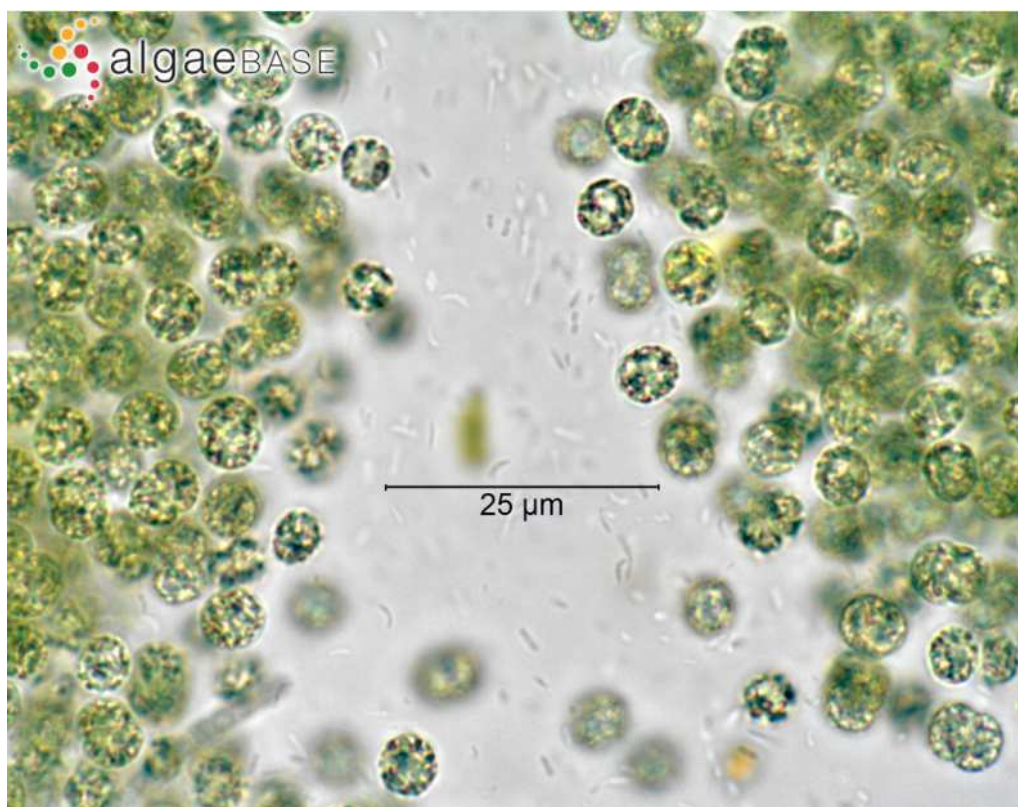


Figura 15 – Células de *Microcystis aeruginosa*. Micrografia de células de *Microcystis aeruginosa*. Fonte: ALGAEBASE, 2006.

As cianobactérias são células procariontes, autotróficas fotossintetizantes, as quais não possuem cloroplasto. Estas células, no entanto, apresentam tilacóides, nos quais a captação de luz ocorre por meio de diferentes sistemas, sendo um constituído por moléculas de clorofila *a* e carotenóides, e outro constituído por ficobilissomos (LUNDELL *et al.*, 1985; JACINAVICIUS, 2015). Estes ficobilissomos são moléculas complexas formadas por ficobiliproteínas, que atuam como receptores de luz durante a fotossíntese. Quando há limitação de nitrogênio, estas proteínas podem funcionar como reserva desta molécula (ABALDE *et al.*, 1998; SUN *et al.*, 2006; SLOTH *et al.*, 2006; JACINAVICIUS, 2015). As cianobactérias possuem também duas estruturas cuja função é o acúmulo de reservas, são elas: carboxissomos (inclusões cristalinas cuja função é promover uma fixação mais rápida de CO₂) e grânulos, que podem ser compostos por cianoficina (cuja função é armazenar nitrogênio), substância semelhante ao glicogênio (o amido das cianofíceas, formado por polissacarídeos constituídos por monômeros de glicose) ou polifosfato (STANIER & COHEN-BAZIRE, 1977; JACINAVICIUS, 2015), ou seja, são células capazes de estocar nitrogênio (na forma de grânulos de cianoficina), fósforo (na forma de grânulos de polifosfato) e dióxido de carbono (nos carboxissomos), respectivamente (FALCONER, 2005; LEE, 2008; YEATES *et al.*, 2008; JACINAVICIUS, 2015). Nas células de cianobactérias, também é possível encontrar vesículas de gás, ou aerótopos, os quais são responsáveis por regular a sua flutuabilidade na coluna d'água (Figura 16) (JACINAVICIUS, 2015).

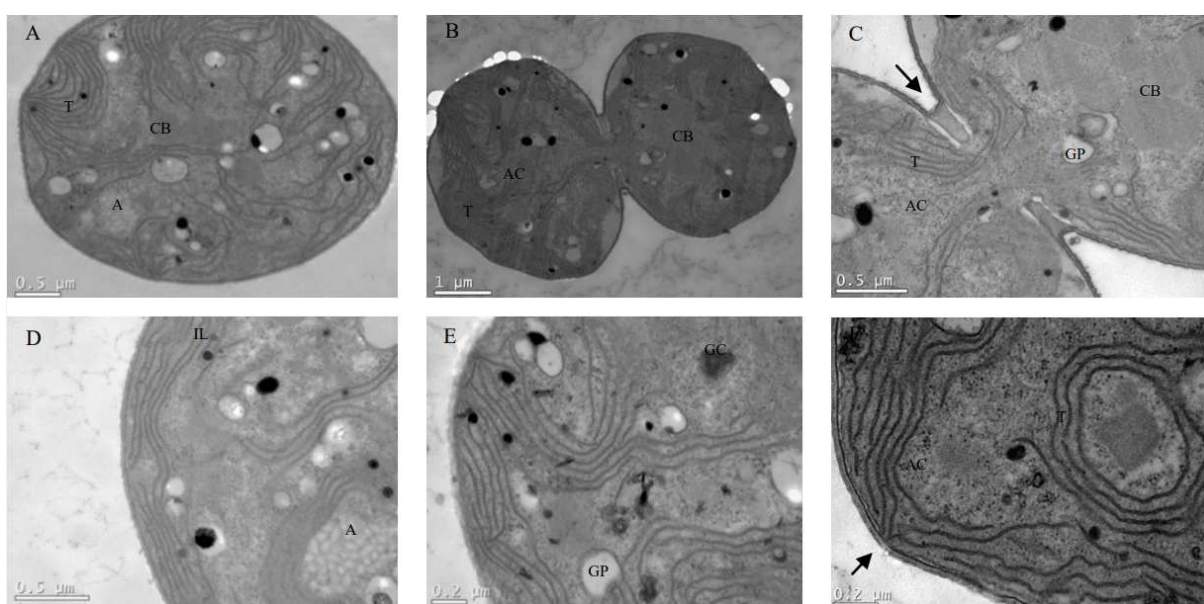


Figura 16 – Micrografias evidenciando as estruturas celulares de *Microcystis aeruginosa*. Micrografia eletrônica de transmissão de células de *Microcystis aeruginosa*. A) Célula com tilacóides; B) Célula em divisão; C) Detalhe da invaginação (seta); D) Aerótopos; E) Grânulos de polifosfato; F) Organização dos tilacóides e da

parede celular (seta). T. Tilacóides, GC. Grânulo de Cianoficina, A. Aerótopos, GP. Grânulo de Polifosfato, AC. Amido das cianofíceas, CB. Carboxissomo, IL. Inclusão lipídica. Fonte: JACINAVICIUS, 2015.

1.4.4. *Cyanoblooms*

Eflorescências algais, *cyanoblooms* ou *algal blooms*, são um fenômeno comum caracterizado pela proliferação de microalgas e cianobactérias, conforme mostrado na **Figura 17**. As cianobactérias são as principais causas deste fenômeno em água doce (GRASSO *et al.*, 2022). Dentre os gêneros mais comuns causadores deste fenômeno encontra-se o gênero *Microcystis*. As cianobactérias deste gênero são capazes de afetar enormemente e negativamente os ecossistemas, uma vez que estas consomem muito do oxigênio do ambiente e, como já mencionado, existem cepas capazes de produzir toxinas, em especial as microcistinas. Estas toxinas são hepatotóxicas, podem induzir a formação de carcinoma hepatocelular, podem causar morte por envenenamento nos animais e humanos, são neurotóxicas, genotóxicas e capazes de afetar a saúde reprodutiva dos seres vivos. Sendo assim, são um grande problema ambiental, pois podem fazer com que a água fique imprópria para o consumo animal (YOSHIDA-TAKASHIMA *et al.*, 2012).



Figura 17 – Fenômeno de eflorescência algal. Fotografia do fenômeno de eflorescência algal causada por *Microcystis* sp. em um rio no estado de Ohio. Fonte: WILHELM *et al.*, 2020.

A frequência, duração e distribuição geográfica dos *blooms* de cianobactérias têm aumentado por causa de mudanças climáticas (como aumento das temperaturas) e da eutrofização dos rios e lagos (**Figura 18**) (GRASSO *et al.*, 2022). Isso acontece, principalmente porque as cianobactérias têm suas taxas de crescimento aumentadas quando as

temperaturas das águas se elevam (YOSHIDA-TAKASHIMA *et al.*, 2012). As cianobactérias, principalmente do gênero *Microcystis*, são capazes de dominar os ambientes mesmo diante de alterações climáticas devido às suas características únicas que vão além da capacidade de crescer em temperaturas mais altas, como mencionado, a capacidade de armazenar fósforo, fixar nitrogênio e de se adaptar a diferentes espectros e intensidades luminosas (JASSIM e LIMOGE, 2013). Utilizar os cianófagos como forma de controlar a proliferação destas cianobactérias pode ser, desta forma, uma alternativa interessante diante do cenário apresentado (BATINOVIC *et al.*, 2019).

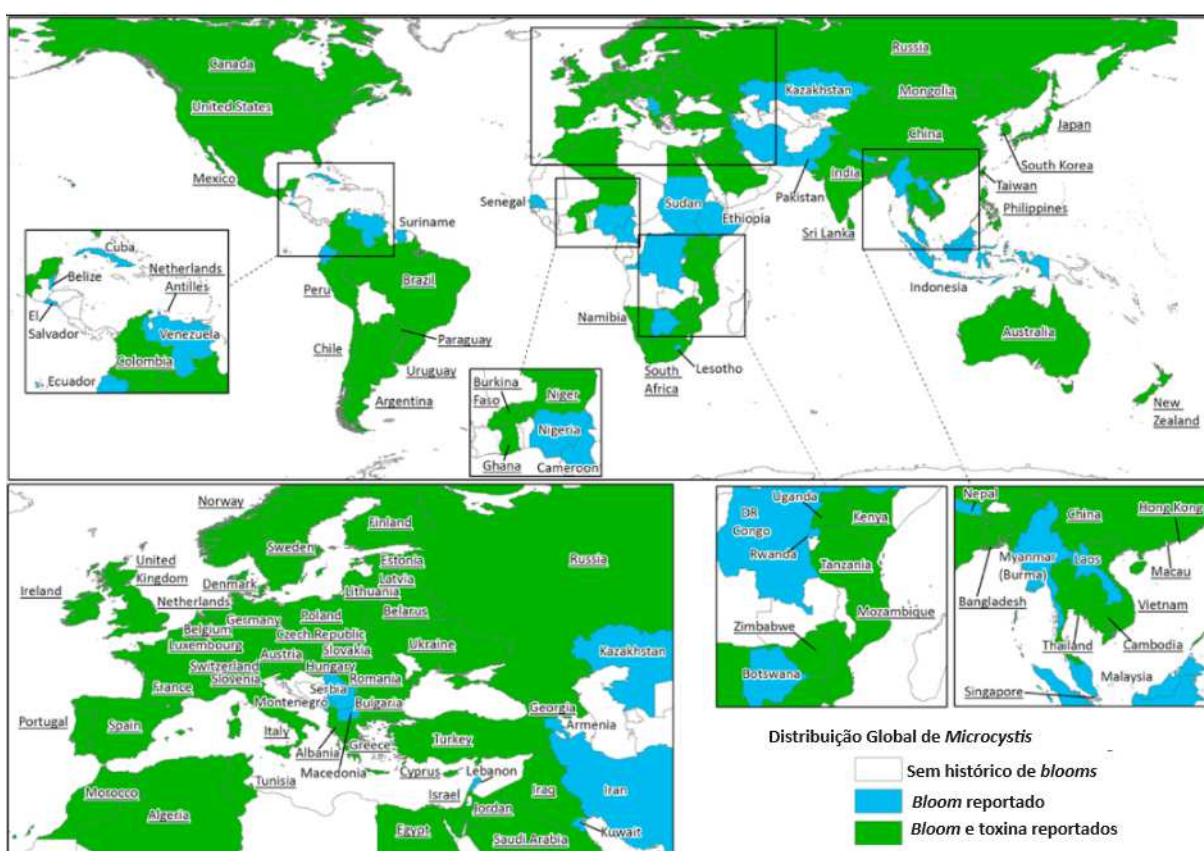


Figura 18 – Distribuição Global dos blooms de causados por cianobactérias do gênero *Microcystis*. A cianobactéria cosmopolita causa “blooms” em todos os continentes, exceto na Antártica. Fonte: HARKE *et al.*, 2016, adaptado pela autora.

1.4.5. Cianófagos como alternativa para controle biológico

Atualmente existem métodos de controle de *cyanoblooms* químicos e físicos, porém estes apresentam algumas desvantagens, tais como custo elevado, possibilidade de impactar negativamente a saúde dos organismos presentes no ambiente e de causar poluição secundária

(GRASSO *et al.*, 2022). O método de controle biológico empregando cianófagos, no entanto, não possui nenhuma dessas desvantagens, inclusive, a aplicação de cianófagos não parece destruir a biodiversidade local, e nunca foi identificada redução na biodiversidade associada à presença dos cianófagos no ambiente (ZHANG *et al.*, 2022). A solução mais sustentável possível é de longo prazo e envolve redução na emissão de gases do efeito estufa e diminuição do aporte de matéria orgânica para as águas. É importante, no entanto, pensar soluções a curto prazo, como o uso de cianófagos para realizar o controle biológico dos hospedeiros (GRASSO *et al.*, 2022).

Alguns fatores ambientais são capazes de alterar a quantidade de partículas virais produzidas por uma única célula, alterar a infectividade dos fagos e prolongar o período de latência destes. A redução da disponibilidade do fósforo, por exemplo, reduz a infectividade dos fagos, diminui a quantidade de partículas produzidas e faz com que o ciclo lisogênico seja preferido. Já o aumento na pressão parcial de gás carbônico é capaz de reduzir o período latente e aumentar a produção de cianófagos. Compreender os efeitos destes parâmetros ambientais na ecologia dos cianófagos é fundamental para a utilização destes como medida de controle dos *blooms* de cianobactérias (GRASSO *et al.*, 2022).

Por estes motivos, o uso de cianófagos no controle dos *blooms* de cianobactérias têm sido alvo de pesquisas. Um dos pontos mais importantes é a capacidade dos cianófagos de ter efeitos mínimos sobre células que não são suas hospedeiras, ou seja, possuem mínimo efeito “*non-target*”, uma vez que eles só se multiplicam na presença de seu hospedeiro. A especificidade de hospedeiro entre estes fagos é variável, e tal versatilidade é fundamental para o desenvolvimento de ferramentas para controlar o crescimento das cianobactérias, uma vez que é possível escolher, de acordo com o que se deseja fazer, qual cianobactéria será o alvo. É possível alterar o perfil de *Microcystis* presente no ambiente, por meio do emprego de cianófagos que infectam somente as cepas produtoras de microcistinas, ou até mesmo remover várias espécies de cianobactérias ao mesmo tempo (empregando fagos que apresentem um espectro de hospedeiros amplo). Para, de fato, empregar os fagos como alternativa para controle dos *blooms* no meio ambiente, é necessário compreender melhor como os fatores ambientais alteram a eficácia deste método, assim como qual a multiplicidade de infecção deve ser empregada e como fazer o escalonamento, e para tal, mais estudos sobre o tema devem ser feitos (GRASSO *et al.*, 2022). É importante isolar e conhecer mais sobre os vírus que infectam não apenas cianobactérias, mas também vírus que infectam diferentes algas, uma vez que os *blooms* algais são causados também por microalgas eucarióticas.

1.5. Perspectivas para isolamento de cianófagos e chlorovírus no Brasil

As regiões tropicais abrigam e geram diversidade biótica, sendo a maior parte da biodiversidade do planeta originada nas regiões intertropicais. No entanto, são regiões que não são extensivamente estudadas, fato que obscurece as respostas às questões fundamentais sobre essa diversidade e como ela evolui (HARVEY *et al.*, 2021). Dentro da zona tropical está o Brasil, um país de dimensões continentais, sendo o quinto maior do mundo em território, no qual seis diferentes biomas ricos em termos de biodiversidade são encontrados. Neste país também são encontradas as maiores reservas de água doce do planeta (COUTINHO, 2016). Tais fatores fazem deste um local interessante para prospectar e estudar os vírus aquáticos de água doce, sobre os quais pouco se sabe a respeito de sua ecologia, quando comparados aos vírus marinhos (NOGUEIRA *et al.*, 2022). O perfil ambiental do Brasil chamou atenção de grupos de pesquisa que se dedicaram à prospecção de vírus gigantes por aqui. A ampla diversidade de ambientes e a dispersão biológica pelos biomas brasileiros possibilitou o isolamento de diversos vírus gigantes nestes diferentes locais, como o tupanvirus soda lake, isolado do Pantanal brasileiro (lagos da Nhecolândia); o tupanvírus *deep ocean*, isolado a partir de sedimentos encontrados a 3000 metros de profundidade nas águas da Bacia de Campos, no Rio de Janeiro; o samba virus (SMBV), isolado da Amazônia brasileira; o cedratvirus getuliensis, isolado de amostras de esgoto no estado de Minas Gerais; o niemeyer virus; faustovirus mariensis e yaravirus, isolados da lagoa urbana da Pampulha; dentre outros (**Figura 19**) (BORATTO *et al.*, 2022). Diversos isolados virais foram provenientes da exploração dos diferentes ambientes aquáticos brasileiros, resultando em mais de 170 isolados virais obtidos, o que revela o potencial do Brasil para o isolamento de novos vírus a partir de amostras ambientais (BORATTO *et al.*, 2022).

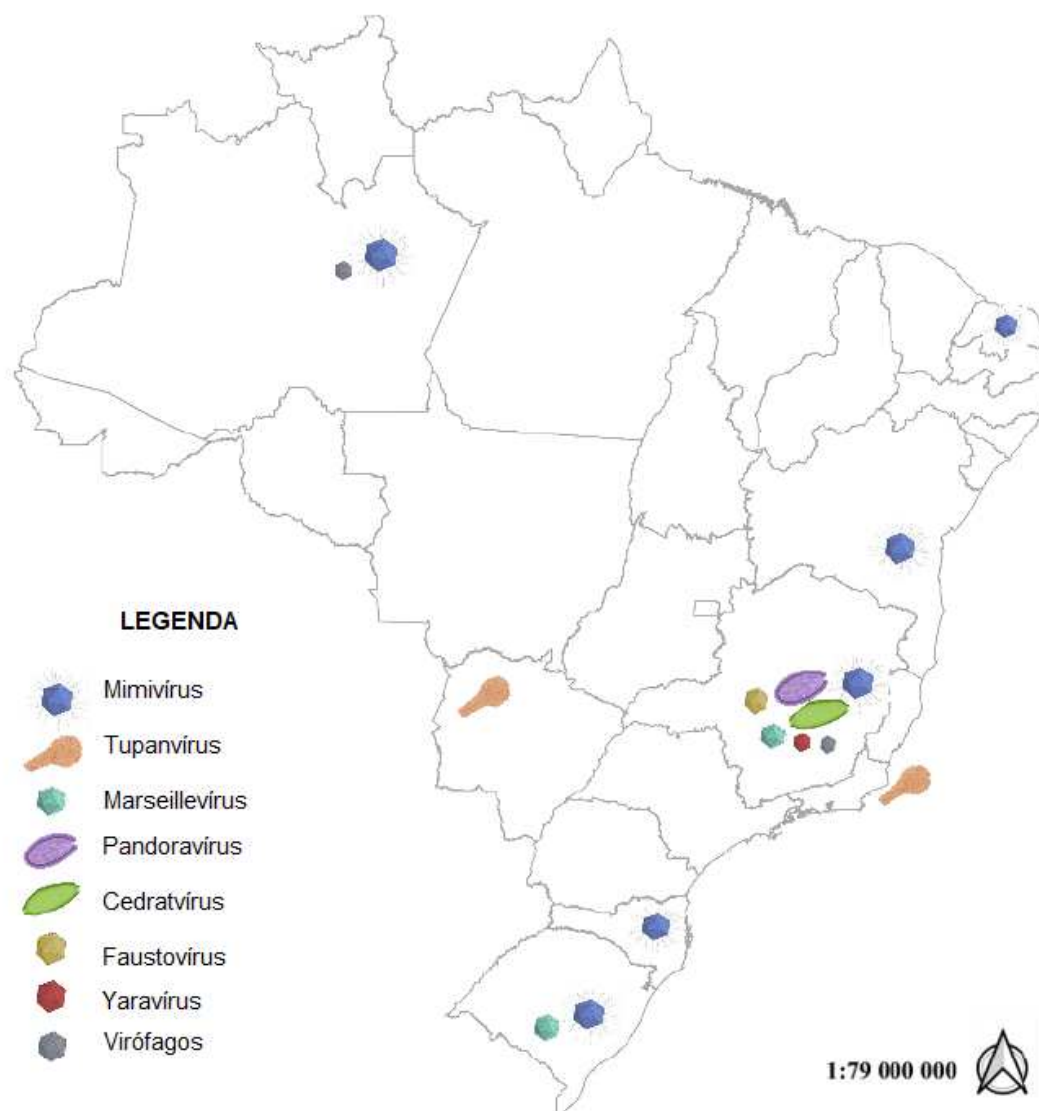


Figura 19 – Locais nos quais foram isolados vírus gigantes no Brasil. Mapa do Brasil destacando os lugares dos quais já foram isolados vírus gigantes. Fonte: Boratto *et al.*, 2022, adaptado pela autora.

Embora as *cyanoblooms* sejam amplamente estudados no Brasil, as investigações não se concentraram no isolamento de cianófagos (SANTOS *et al.*, 2021). Contudo, isso não significa que estes vírus não ocorram em águas brasileiras. Em um trabalho de Santos e colaboradores (2021), foram identificados por metagenômica cianófagos que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*, sendo um indício interessante da presença destes vírus em território nacional. A escassez de estudos que têm como objetivo encontrar cianófagos em amostras de água doce no Brasil, faz com que sejam fundamentais os estudos de prospecção nestes ambientes, visando aumentar a compreensão e conhecimento da biodiversidade viral nacional. O mesmo acontece com os vírus que infectam algas do gênero *Chlorella*.

Acredita-se que estes vírus sejam ubíquos, no entanto, apenas um único isolado brasileiro é conhecido, o Br0604L, o qual foi isolado em 2006 por pesquisadores norte-americanos (**Figura 20**). O *Acanthocystis turfacea* *Chlorella* vírus Br0604L é um SAG vírus sobre o qual pouco se sabe a respeito de suas características morfológicas, estruturais, ciclo de multiplicação e espectro de hospedeiro (JEANNIARD *et al.*, 2013).



Figura 20 – Locais de onde foram isolados chlorovírus no planeta até o momento. Mapa mundi indicando a localidade dos isolados de chlorovírus no mundo. O tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de isolados obtidos no local. Fonte: Rodrigues *et al.*, 2022.

1.4. Importância do desenvolvimento de metodologias na virologia

Diversos ramos da ciência podem ser definidos em grande parte por suas técnicas, e a virologia não foge a esta regra. A natureza única dos vírus e infecções virais exige um conjunto de metodologias exclusivas designadas especificamente para o estudo destas entidades biológicas. Por outro lado, isso faz com que o que nós conhecemos (e podemos conhecer) a respeito dos vírus seja delimitado pelas técnicas usadas e, sendo assim, o entendimento da virologia requer uma compreensão clara dos métodos virológicos (FIELDS *et al.*, 2013). Por serem entidades biológicas peculiares, a descoberta dos vírus foi retardada, já que os métodos conhecidos ao final do século XIX usados para detectar outros

microrganismos não eram efetivos para o isolamento destes. O microscópio óptico usado para visualizar bactérias, por exemplo, não permitia a identificação de vírus. Um dos primeiros indícios da existência dos vírus foram os experimentos de Ivanoski em 1892, o qual reportou que mesmo quando filtrados (em filtros que eram considerados esterilizantes por reterem bactérias), os extratos de folhas de tabaco adoecidas preservavam suas propriedades infecciosas. Foi então que se descobriu a existência de agentes infecciosos filtráveis. Ivanovski concluiu que o agente infeccioso provavelmente era alguma toxina bacteriana ou uma pequena bactéria que passa pelos poros dos filtros. Martinus Beijerinck em 1898, no entanto, não conseguiu isolar quaisquer bactérias dos tecidos vegetais ou filtros, o que indicava que o agente etiológico não era uma bactéria. Martinus notou, porém, que mesmo quando o extrato estava muito diluído, este ainda era capaz de infectar as plantas. Ele foi o primeiro pesquisador a dar o nome de “vírus” ao agente responsável pelo mosaico do tabaco. Foi apenas em 1935 que a evolução das técnicas de purificação de enzimas permitiu a Wendell Stanley produzir a primeira preparação de vírus purificados, quando obteve os cristais do vírus do mosaico do tabaco (TMV). Analisando quimicamente estes cristais, concluiu-se que o TMV era uma proteína autocatalítica que se multiplicava nas células vivas. Cerca de um ano depois, Bawden mostrou por meio de estudos de difração de raios X dos cristais do TMV a presença de elementos com estrutura e tamanho regulares, contendo proteínas e RNA. Depois disso, o TMV foi, então, observado por microscopia eletrônica em 1939, sendo o primeiro vírus a ser visualizado empregando esta técnica, suas partículas virais são estruturas rígidas de 150 a 300 nm de comprimento. (LECOQ 2001; BEIJERINCK 1898; STANLEY 1935; BAWDEN 1936).

Alguns dos primeiros métodos usados para produção de vírus envolviam o uso de ovos embrionados de galinha, os quais foram introduzidos na virologia por Goodpasture e colaboradores em 1932. O embrião de galinha em desenvolvimento fornece uma variedade de tecidos diferenciados que servem como substratos para o crescimento de uma grande variedade de vírus, incluindo ortomixovírus, paramixovírus, rabdovírus, togavírus, herpesvírus e poxvírus. Cada vírus causa alterações discretas e características quando introduzidos na membrana corioalantóica de ovos embrionados, sendo assim um método capaz de fornecer informações para identificação dos tipos de vírus ou avaliar a patogenicidade destes. Embora os ovos embrionados tenham sido deveras importantes para a virologia, eles foram quase totalmente substituídos por técnicas de cultivo celular, sendo

usados atualmente, principalmente na produção de vacinas, o que mostra a importância destes métodos para a humanidade até os dias de hoje (FIELDS *et al.*, 2013).

O isolamento e a propagação de rotavírus em culturas de células, por exemplo, só aconteceu depois do desenvolvimento de técnicas específicas. Antes disso, as tentativas de isolamento destes vírus eram realizadas por meio do uso de animais. Relatados pela primeira vez em 1973 por Bishop e colaboradores a partir de amostras fecais de crianças doentes, os rotavírus são vírus não envelopados membros da família *Reoviridae*, são importantes agentes etiológicos de gastroenterite aguda em bebês e crianças pequenas, e possuem três camadas de capsídeos. Estas camadas são características importantes destes vírus, que só puderam ser cultivados *in vitro* quando foi descoberto que era necessário submetê-los à ação de proteases. O tratamento com estas enzimas promove a clivagem da proteína do capsídeo mais externo, aumentando assim a infectividade do vírus. Nos animais e humanos, tal clivagem é promovida pelas proteases do trato gastrointestinal, dessa forma, este vírus se mantém estável no ambiente ao mesmo tempo em que infecta com certa facilidade as células do trato gastrointestinal. A descoberta de que era necessário simular a ação das proteases dos hospedeiros possibilitou o isolamento e cultivo deste agente etiológico para fins diagnósticos, que era feito até então por microscopia eletrônica (BISHOP *et al.*, 1973; ARIENTOVA *et al.*, 2012, SAIF *et al.*, 1988). Como é possível notar, o desenvolvimento e aperfeiçoamento de métodos são fundamentais para o avanço da virologia como um todo.

2. JUSTIFICATIVA

O Brasil é um conhecido *hotspot* de biodiversidade, o qual possui extensão continental e 6 diferentes biomas com características e espécies distintas e únicas, além de apresentar uma riqueza hídrica ímpar, tendo as maiores reservas de água doce do mundo. Não existem, no entanto, grupos de pesquisa brasileiros dedicados a explorar vírus que infectam microalgas (sobretudo do gênero *Chlorella*) e cianobactérias, hospedeiros que são amplamente distribuídos em águas brasileiras, sendo, portanto, o Grupo de Estudo em Phycodnavírus, pioneiro neste campo. Vírus de algas e cianobactérias estão presentes em abundância nos ambientes de água doce, porém, paradoxalmente, há uma escassez de estudos com foco na prospecção e caracterização destes vírus no Brasil, o que mostra a importância de se realizar trabalhos como este, uma vez que se pretende alcançar melhor compreensão e entendimento da biodiversidade viral local e contribuir para o avanço da virologia nacional.

Considerando a complexidade dos genomas dos vírus do filo *Nucleocytoviricota*, sua grande extensão e quantidade de CDS inéditas, o isolamento e caracterização de novos chlorovírus pode abrir portas para a descoberta e caracterização de novas proteínas, as quais podem representar novas soluções para alguns dos problemas da humanidade, como ocorreu com a endonuclease CvIAII de chlorovírus. Além disso, os cianófagos também apresentam diversas regiões de codificação (CDS) inéditas e únicas na natureza, podendo ser, também, promissores sob o ponto de vista biotecnológico.

Explorar novos ambientes em busca de cianófagos e vírus que infectam algas verdes do tipo *Chlorella* pode auxiliar, também, na compreensão deste grupo tão diverso. Novos isolados podem ajudar na resolução das lacunas relacionadas à filogenia e biologia e genética destes vírus.

O isolamento de novos cianófagos pode ser importante também para o controle dos *blooms* de cianobactérias, que são um importante problema ambiental, e que tendem a acontecer cada vez mais devido ao aquecimento global e eutrofização de rios, lagos e reservatórios de água doce. O uso destes vírus pode ser uma alternativa interessante e de baixo impacto ambiental para o controle deste fenômeno, principalmente porque as soluções para controle de cianobactérias empregadas atualmente não são eficazes ou ecologicamente atrativas.

Sendo a descoberta e caracterização destes vírus supracitados tão importante, faz-se imprescindível o desenvolvimento, adaptação e padronização de técnicas que permitam o isolamento e a caracterização de vírus de algas e cianobactérias, uma vez que uma

metodologia adequada é fundamental para o conhecimento e entendimento da biologia dos vírus.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Definir, testar e padronizar métodos visando o isolamento e a caracterização de novos vírus associados à cianobactérias e microalgas.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Desenvolver protocolos visando o isolamento e caracterização de cianófagos e vírus que infectam microalgas;

3.2.2. Padronizar protocolos para prospecção e caracterização de isolados brasileiros;

3.2.3. Prospecionar cianófagos em amostras de água doce de Minas Gerais;

3.2.4. Prospecionar vírus que infectam microalgas em amostras de água doce de Minas Gerais;

3.2.5. Caracterizar biologicamente e morfológicamente os isolados e os efeitos causados sobre as células hospedeiras.

4. METODOLOGIA

4.1. Obtenção de amostras ambientais

Foram utilizadas amostras ambientais provenientes de uma coleta realizada em 1 de junho de 2022 no Parque Nacional da Serra do Cipó, Minas Gerais (SISBIO: 83737-1; SISGEN: A048F34). Foram coletadas amostras do Rio Cipó em dez diferentes pontos, totalizando 10 amostras. As amostras foram acondicionadas em falcons estéreis, transportadas para o Laboratório de Vírus e posteriormente foram filtradas em filtros de seringa de porosidade 0,45 micrômetros e armazenadas sob refrigeração a 4°C. Além disso, foi utilizada também uma amostra gentilmente cedida pela Professora Dra. Vera Lúcia, a qual foi coletada na Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Onça, vinculada a Unidade Territorial Estratégica Ribeirão Onça, parte da Bacia Hidrográfica do Rio das Velhas. Esta amostra foi posteriormente acondicionada sob refrigeração, assim como as demais.

4.2. Obtenção de culturas de *Chlorella* e *Microcystis*

Foram utilizadas culturas de algas e cianobactérias já estabelecidas as quais foram isoladas a partir de amostras ambientais, das espécies *Chlorella vulgaris* (isolada no Córrego da Mina em 2010), *Microcystis aeruginosa* (isolada na Lagoa Jacaré – Parque Estadual do Rio Doce (PERD) em 2004). Estas células foram gentilmente cedidas pelo Professor Dr. Francisco Barbosa, do Laboratório de Limnologia e Ecologia Aquática do Departamento de Genética, Ecologia e Evolução do ICB/UFMG. Além destas, foram utilizadas células da espécie *Chlorella variabilis* de duas diferentes linhagens, NC64A e Syngen 2-3, as quais foram cedidas gentilmente pelo professor Dr. James Van Etten, do Nebraska Center for Virology, University of Nebraska-Lincoln, EUA. Além destas células, o professor Van Etten também nos cedeu o estoque viral de PBCV-1 que foram usados como controles positivos neste trabalho. Uma cultura de *Chlorella vulgaris* e outra de *Chlorella minutissima* também nos foi gentilmente cedida pela Dra. Inessa Lacativa, do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

4.3. Cultivo e manutenção das algas e cianobactéria

As células de *Chlorellas vulgaris* e *C. minutissima* foram cultivadas em Meio Basal de Bold (BBM), sob luz contínua a 25 °C (VAN ETTEN *et al.*, 1983; NICHOLS e BOLD, 1965) em incubadora. Foram utilizadas duas lâmpadas de 20W na incubadora visando garantir a iluminação adequada para o crescimento celular. As cianobactérias foram cultivadas no mesmo ambiente, sob as mesmas condições utilizadas para cultivo das clorélas. Sob

condições similares foram cultivadas as *Chlorellas variabilis*, no entanto, o meio utilizado para o cultivo destas é o Meio Basal de Bold Modificado (MBBM), no qual é adicionado de tetraciclina (10 µg/mL), uma vez que este meio possui sacarose e bacto-peptona, e conseqüentemente é mais rico e suscetível à contaminação. Apenas as culturas de *Chlorella variabilis* são axênicas.

Para a realização dos experimentos e subcultivos foi realizada contagem das células na Câmara de Neubauer. O subcultivo das células foi feito em erlenmeyers tampados por uma rolha ou rosca, no qual são colocadas frações de meio e de cultura de células. O subcultivo foi feito uma vez por semana para as células de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella minutissima* e *Microcystis aeruginosa*, e as proporções utilizadas para estas são 1:3 (dois terços de meio autoclavado, e um terço de células em suspensão). As células de *Chlorella variabilis* se multiplicam mais rapidamente que as demais, e dessa forma os repiques foram feitos respeitando um intervalo de no máximo cinco dias, e a proporção mantida foi de 1:5. A definição destas proporções foi feita após alguns testes nos quais os subcultivos eram feitos usando diferentes proporções, as que forneciam uma cultura rica em células no intervalo de uma semana ou cinco dias sem que estas ficassem amareladas ou houvesse sinal de excesso de células (cor muito intensa, por exemplo) foram as proporções mantidas.

4.3.1. Curvas de crescimento das algas e cianobactéria

Visando compreender o perfil de crescimento das algas e cianobactérias, foram feitas curvas de crescimento das culturas. Para tal, as células em cultura foram contadas em Câmara de Neubauer, foram feitos cálculos visando descobrir qual o volume a ser coletado da cultura o qual forneceria 1×10^6 células totais, e este volume foi inoculado em um erlenmeyer, no qual foram acrescidos 50 mL de meio de cultura. Dessa forma, a concentração inicial destas culturas usadas para a curva de crescimento foi de 2×10^4 células/mL. Foram feitas contagens das células em Câmara de Neubauer nos dias 3, 5, 7, 11, 14 e 17 pós-inóculo (dpi) para a curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* (isoladas a partir de amostras de Minas Gerais, doravante chamadas de *Chlorella vulgaris* MG); 4, 6, 11, 14 e 18 dpi para a curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* (isoladas a partir de amostras de São Carlos, doravante chamadas de *Chlorella vulgaris* SC) e *Chlorella variabilis* Syngen 2-3; e 3, 5, 7, 10 e 12 dpi para a curva de crescimento de *Chlorella minutissima*. A curva de crescimento de *Chlorella minutissima* foi realizada a partir de um volume de meio de cultura de 100 mL e 5×10^6 células totais, ou seja a concentração inicial neste caso era de 5×10^4 células/mL.

4.3.2. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias cultivadas em meio contendo antimicrobiano

Para avaliar os efeitos no crescimento das células da adição de antimicrobianos nos meios de cultura, foram feitas curvas de crescimento utilizando meio suplementado com tetraciclina (10 µg/mL). A contagem de células na Câmara de Neubauer ocorreu 3, 5, 7, 10 e 12 dpi para todas as espécies e cepas. Partiu-se de um volume de meio de cultura igual a 100 mL e 5×10^6 células totais, ou seja a concentração inicial foi de 5×10^4 células/mL. Os resultados de todas as curvas de crescimento são representativos de experimentos independentes.

4.3.3. Preservação dos estoques celulares em meio sólido

Nos foram cedidos protocolos para o cultivo e manutenção das *Chlorellas variabilis* pelo professor Dr. James Van Etten, os quais relatam a importância de iniciar novas culturas a cada dois meses a partir de slants (tubos de ensaio contendo meio de cultura sólido inclinado), uma vez que células de *Chlorella variabilis* que passam por subsequentes subcultivos começam a apresentar células anormais (cerca de seis meses já são suficientes para o surgimento destas). Para fazer estes slants, um volume de cerca de 7 mililitros de meio MBBM-ágar 1,5% fundido são colocados em um tubo falcon de 15 mL inclinado. Após resfriamento e solidificação do ágar, 30 µL das culturas de células são inoculados sob a superfície inclinada com o auxílio de uma alça plástica calibrada. Os tubos são deixados na incubadora refrigerada sob luz constante a 25°C por 10-14 dias para que as células cresçam sobre a superfície inclinada. Em seguida os slants são transferidos para geladeira, onde são mantidos sob refrigeração até o momento do uso. Para iniciar uma nova cultura a partir destes, é necessário colocar meio dentro do tubo falcon para solubilizar as células, as quais, em suspensão, são transferidas para um erlenmeyer e adicionadas de meio MBBM. Este método foi baseado no protocolo supracitado com algumas pequenas adaptações. Após diversas tentativas de se fazer estes slants, os parâmetros que renderam slants mais ricos em células e sem contaminação são os descritos neste tópico.

4.4. Iniciando a prospecção viral

Para realizar a prospecção de vírus em amostras de água doce, uma série de experimentos foi realizada visando definir e adaptar as melhores técnicas para tal objetivo.

4.4.1. Etapa de enriquecimento prévio das amostras

Visando ampliar as probabilidades de se isolar vírus a partir das amostras ambientais, foi realizada uma etapa de enriquecimento prévio das amostras. Esta etapa teve como referência um protocolo usado para isolamento de fagos, o qual foi gentilmente cedido pelo Professor Dr. Gabriel de Almeida da Arctic University of Norway, Tromsø, Noruega. Inicialmente as amostras são clarificadas por centrifugação a 4000 xg por 10 minutos em centrífuga digital Allegra X-30 da marca Beckman Coulter com rotor para 24 tubos. Em seguida ocorre a filtração do sobrenadante em filtros de membrana de 0,45 µm. São coletados 3,5 mL do filtrado e adicionados a 0,5 ml da cultura de células (de *Chlorella vulgaris*, *Chlorella variabilis* ou *Microcystis aeruginosa*, todas em fase logarítmica de crescimento) e a 1 mL de meio BBM concentrado (5X) em um tubo falcon de 15 mL, o qual é incubado por 5 dias em Incubadora Shaker (SL 222) sob luz contínua e 150 rpm. Em seguida os tubos são centrifugados e filtrados conforme descrito acima, e os filtrados são armazenados sob refrigeração.

4.4.2. Padronização dos ensaios de placa - Método *Double-layer*

Foram executados diferentes protocolos de ensaios de placa com o objetivo de definir os melhores parâmetros para estes testes. Os ensaios de placa foram feitos usando células de *Chlorella variabilis* (NC64A), *Microcystis aeruginosa* e *Chlorella vulgaris* (SC e MG).

- Método *double-layer* em placa de Petri: o método *double-layer* é um método conhecido para isolamento de fagos, e uma adaptação deste foi feita por Van Etten e colaboradores (1983). Este protocolo de 1983 foi testado e posteriormente adaptado usando como referência o trabalho de Quispe e colaboradores (2016). Para realizar os ensaios de placa, primeiro é necessário obter um concentrado de células. A cultura de células em fase exponencial de crescimento (cerca de 5 dias após subcultivo) é centrifugada a 4000 xg por 10 minutos em centrífuga digital e o sobrenadante é descartado. São feitos cálculos de concentração de soluções visando encontrar o volume no qual o pellet de células será ressuscitado, de forma a sempre obter um concentrado de células cuja concentração final é 4×10^8 células/mL. Para realização destes cálculos é necessário saber a concentração inicial das culturas, e para tal, são feitas contagens em câmara de Neubauer. Inicialmente os ensaios de placa eram feitos segundo o protocolo de 1983 (VAN ETTEN *et al.*, 1983), com algumas pequenas adaptações. Em placas de Petri, 15 mL de BBM-ágar 1,5% fundido eram despejados. Após a solidificação deste, era colocada uma mistura de 250 µL do concentrado de

células junto de 100 μL de amostra e 3 mL de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido sobre a camada de ágar 1,5%. As placas eram incubadas por um período de até 15 dias em incubadora sob luz constante a 25°C. Para todos os controles celulares usados em todos os ensaios de placa, é usado meio BBM ou MBBM (a depender o meio usado no cultivo da célula) ao invés da amostra (preservando, assim, a volumetria e as concentrações). No segundo protocolo usado para os ensaios de placa, 900-1000 μL de amostra foram usados, além de um volume de 4 mL de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido (QUISPE *et al.*, 2016). Para todos os ensaios de placa, um tempo de pausa de quarenta e cinco minutos é feito com o objetivo de promover a adsorção das partículas virais às células. Durante o tempo de adsorção apenas a amostra e o concentrado de células são misturados em tubos falcon, e é após esse tempo que o *soft*-ágar fundido é inserido na mistura. Para otimizar os ensaios de placa, foram elaborados protocolos que pudessem promover o processamento de diversas amostras ao mesmo tempo, os quais estão descritos abaixo.

- Método *double-layer* em placa de seis poços: Para encontrar a melhor forma de se realizar os ensaios de placa em placas de seis poços, foram feitos ensaios usando diferentes parâmetros para definir qual o protocolo mais apropriado. Na primeira condição (I), o número de células por poço que será utilizado foi definido arbitrariamente. Foram usados 3 mL de BBM-ágar 1,5% fundido, que foram despejados sobre o poço. Após a solidificação deste, foi colocada sobre a primeira camada uma mistura de 200 μL do concentrado de células junto de 800 μL de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido. Após a solidificação da segunda camada, foram inoculados sobre ela 100 μL de meio BBM para simular a amostra. Para a segunda condição (II), foi calculada a proporção entre a área da placa de Petri e a área do poço na placa de seis poços. Usando a quantidade de células calculadas a partir desta proporção, foram adicionados 3 mL de BBM-ágar 1,5% fundido. Após a solidificação deste, é colocada uma mistura de 70 μL do concentrado de células junto de 930 μL de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido (volume de ágar necessário para completar 1 ml da segunda camada), após a solidificação e sobre a segunda camada, foram inoculados cem μL de meio BBM para simular a amostra. E por fim, foi calculada a proporção entre o volume da placa de Petri e o volume do poço na placa de seis poços, para a terceira condição (III). Usando a quantidade de células calculadas a partir desta proporção, foram adicionados 3 mL de BBM-ágar 1,5% fundido. Após a solidificação deste, é colocada

uma mistura de 230 μL do concentrado de células junto de 770 μL de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido (volume de ágar necessário para completar 1 ml da segunda camada). Após a solidificação da segunda camada, foram inoculados cem μL de meio sobre ela para simular a amostra. As três condições (quantidade de células arbitrárias, e definida por critérios de volume e área) foram testadas sem a adição de uma primeira camada de ágar 1,5%. As placas foram incubadas por um período de até 15 dias em incubadora refrigerada sob luz constante a 25°C.

- Método *double-layer* em placa de vinte e quatro poços: para o método usando placas de 24 poços, foram testados diferentes parâmetros, conforme foi feito para a placa de seis poços. Para que a compreensão deste experimento seja facilitada, um quadro foi elaborado mostrando os diferentes parâmetros usados (**Tabela 2**). O meio foi usado para simular as amostras.

Tabela 2 – Parâmetros utilizados para realização dos ensaios de placa em placa de 24 poços

	Poços com quantidade de células definidas arbitrariamente	Poços com quantidade de células definidas pela proporção das áreas dos poços	Poços com quantidade de células definidas pela proporção dos volumes dos poços
Poço	1.1: 100 μL de concentrado de células +100 μL de meio	2.1: 15 μL de concentrado de células +185 μL de meio	3.1: 60 μL de concentrado de células +140 μL de meio
Poço	1.2: 100 μL de concentrado de células +100 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a camada solidificada	2.2: 15 μL de concentrado de células +185 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a camada solidificada	3.2: 60 μL de concentrado de células +140 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a camada solidificada
Poço	1.3: 100 μL de concentrado de células +100 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a segunda camada solidificada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)	2.3: 15 μL de concentrado de células +185 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a segunda camada solidificada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)	3.3: 60 μL de concentrado de células +140 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio inoculado sobre a segunda camada solidificada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)
Poço	1.4: 100 μL de concentrado de células +100 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada	2.4: 15 μL de concentrado de células +185 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada	3.4: 60 μL de concentrado de células +140 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada
Poço	1.5: 100 μL de concentrado de células +100 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)	2.5: 15 μL de concentrado de células +185 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)	3.5: 60 μL de concentrado de células +140 μL de <i>soft</i> ágar +100 μL de meio misturado a segunda camada +uso de primeira camada de ágar 1,5% (300 μL)

Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.3. Avaliação da influência de microrganismos cultivados junto às microalgas nos ensaios de placa

Considerando que as culturas de *Chlorella vulgaris* MG, *Chlorella vulgaris* SC, *Chlorella minutissima* e *Microcystis aeruginosa* não são culturas axênicas, foram feitos ensaios de placa utilizando o método *Double-layer* para analisar a influência dos microrganismos cultivados junto às microalgas nos ensaios de placa. Os ensaios foram feitos conforme padronizado: em uma placa de Petri foram despejados 15 mL de BBM-ágar 1,5%, e, após a solidificação desta

camada, foi despejado sobre ela uma mistura contendo 250 μL do concentrado de células (obtido conforme descrito no tópico anterior), 4 mililitros de *soft* BBM-ágar 0,75% fundido a uma temperatura de cerca de 50°C e 1 mililitro de meio BBM autoclavado. As placas foram incubadas e observadas por um período de 15 dias para análise de crescimento microbiano.

4.4.4. Triagem em placa de 96 poços

Buscando otimizar a prospecção, foi feito um ensaio para definir como seriam feitos os experimentos de triagem de amostras em placas de 96 poços. Foram testadas diferentes configurações usando diferentes quantidades de células em suspensão de *Microcystis aeruginosa* e *Chlorella vulgaris*. Nos poços intitulados A'' e E'' (**Figura 21**), o critério utilizado para definir o número de células a serem usadas por poço foi o de área, no qual foi calculada a proporção entre a área da placa de Petri e a área do poço na placa de 96 poços. Esta proporção foi aplicada para descobrir o número ideal de células totais a serem utilizadas neste poço, o qual foi 324 vezes menor que o número de células totais usadas nos experimentos feitos em placas de Petri, um total de 4×10^5 células por poço. Nos poços B'' e F'' o número de células foi definido arbitrariamente, sendo 50 vezes menos células, um total de $2,4 \times 10^6$ células por poço. O terceiro critério (poços C'' e G'') foi usado o diâmetro dos poços para calcular as proporções, o que significa 18 vezes menos células, um total de $6,7 \times 10^6$ células por poço. E, por fim, nos poços D'' e H'', um total de $1,6 \times 10^7$ células por poço foi utilizado, este número de células é 7,5 vezes menor que o utilizado nas placas de Petri, e era o número de células/poço padrão utilizado pelo grupo nos experimentos de prospecção em placa de 96 poços. O protocolo final proposto para a etapa de triagem em placa de 96 poços preconiza que em um poço devem ser usados 100 μL de cultura de células contendo $2,4 \times 10^6$ células, junto de 100 μL de amostra (ou meio de cultura no controle celular). Duas colunas com controles celulares devem ser feitas, seguidas de colunas contendo as amostras a serem testadas, cada amostra será, dessa forma, testada em oito replicatas. As placas de 96 poços devem ser incubadas em incubadora refrigerada a 25°C sob luz constante por 15 dias, ou até ser observado algum efeito (estiolamento, branqueamento, lise celular).

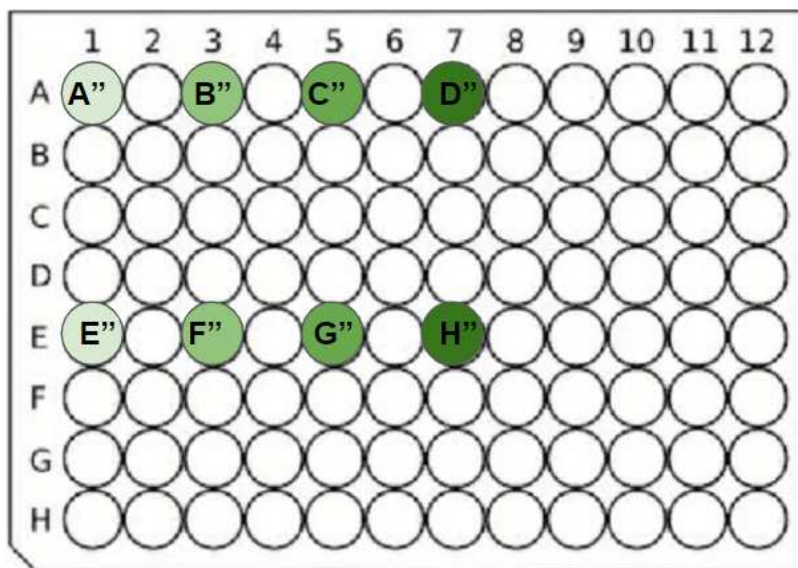


Figura 21 – Representação da placa de 96 poços utilizada para definir o melhor número de células/poço. Em: A'' e E'': o critério utilizado para definir o número de células/poço de *Microcystis aeruginosa* e *Chlorella vulgaris*, respectivamente, foi o de área; Em B'' e F'' o número foi definido arbitrariamente; Nos poços C'' e G'' foi usado critério de diâmetro; Nos poços D'' e H'' número de células padrão utilizado pelo grupo nos experimentos de prospecção em placa de 96 poços. Fonte: Elaborado pela autora.

4.5. Prospectando de cianófagos

Alguns métodos foram testados e adaptados apenas para ensaios realizados com cianobactérias, uma vez que os ensaios de placa usando o método *Double-layer* funcionam muito bem com células e amostras de *Chlorellas*, não sendo necessárias outras técnicas.

4.5.1. Prospecção em meio líquido

Para realizar os ensaios de prospecção em meio líquido, uma placa de 6 poços foi empregada. Em cada poço foram colocados 5 mL de amostra previamente enriquecida e 1 mL de cultura de células (previamente contadas) a uma concentração de $2,5 \times 10^6$ células/mL (QIAN *et al.*, 2022). Para os controles celulares foram utilizados 1 mL da cultura de células supracitada, 4 mL de BBM e 1 mL BBM concentrado 5 vezes, visando simular a composição química da amostra previamente enriquecida. As amostras são incubadas em incubadora refrigerada a 25°C sob luz contínua por um período de 15 dias, ou até observação de efeito em algum poço (estiolamento, branqueamento, lise celular).

4.5.2. Ensaios de placa - *Microcystis aeruginosa*

Além do método *double-layer*, outros métodos usados classicamente para isolamento de fagos foram performados e adaptados usando células de *Microcystis aeruginosa*.

- *Spot assay* ou ensaio de *Spot* - Este método foi adaptado a partir do protocolo utilizado por Fong e colaboradores (2017), e consiste no espalhamento de 50 µL de cultura de células concentrada (cerca de 10^7 células) com o auxílio de uma alça de Drigalski sob uma placa de Petri com meio BBM acrescido de ágar (à concentração de 1,5%) solidificado de forma que as células formem um tapete. Aplica-se sobre a placa 4 µL de cada amostra (e de meio BBM, no controle celular) com o auxílio de uma micropipeta, as placas são acondicionadas em incubadora sob luz contínua a 25°C e observadas após 24h, 48h, 72h e 120h (MIRZAEI *et al.*, 2015; FONG *et al.*, 2017).
- *Spot assay* modificado - Plaqueamento completo: uma adaptação da técnica acima foi também empregada, e foi intitulada “*Spot assay* modificado”. É semelhante ao método descrito no tópico superior, no entanto, ao invés de gotejar as amostras sobre o tapete, 50 µL da amostra são misturados aos 50 µL do concentrado de células e só então são despejados sobre a placa, formando assim um tapete de células junto da amostra. Nos controles celulares são usados 50 µL de meio BBM.
- Técnica de *droplet*- Ainda, uma adaptação das técnicas acima (*spot*) foi também executada, e foi intitulada técnica de *droplet*. Nesta são misturados 10 µL de cultura de células (cerca de 10^6 células) a 10 µL de amostra. Sobre uma Placa de Petri contendo meio BBM acrescido de ágar a 1,5% solidificado são adicionadas 8 gotas espaçadas entre si contendo 10 µL da solução preparada acima com o auxílio de uma micropipeta. As placas são observadas após 24h, 48h, 72h e 120h, a fim de identificar alterações visuais como surgimento de placas de lise e mudanças na cor. As placas são acondicionadas em incubadora sob luz constante a 25 °C.

4.5.3. Análises comparativas genômicas e filogenômicas de fagos que infectam *Microcystis*

Para obtermos uma dimensão melhor da diversidade de fagos que infectam *Microcystis* e avariar o que seria possível encontrar em amostras brasileiras, especialmente em relação às características genéticas destes vírus, realizamos diversas análises *in silico* envolvendo os cianófagos com genomas disponíveis em bancos de dados públicos. Os genomas completos dos fagos que infectam o gênero *Microcystis* foram encontrados após a realização de buscas no GenBank. As palavras usadas na busca foram “*Microcystis* phages”. Após a obtenção dos genomas, estes foram submetidos à ferramenta GeneMarkS, a qual faz a predição *de novo* das

CDS, o parâmetro selecionado na aba “Sequence type” foi o “Phage”. Após a análise das predições de genes feitas pela ferramenta, todas as CDS contendo menos de 30 aminoácidos foram excluídas. Para predição de genes de tRNAs, foram utilizados dois programas: tRNAscan-SE e Aragorn. No Aragorn, o parâmetro linear foi selecionado para genomas lineares, e o circular para genomas circulares. Já no tRNAscan-SE, o parâmetro “Sequence source” selecionado foi o “mixed (general tRNA source)”. A montagem dos COGs (Clusters of Orthologous Genes, grupos de genes ortólogos) foi realizada por meio da ferramenta ProteinOrtho, com os seguintes parâmetros: “Similaridade recíproca mínima em %” igual a 30, “e-valor” limite de 0,001, “Cobertura mínima dos melhores alinhamentos em %” de 50 e “Porcentagem mínima de identidade em %” de 25. Além disso, as opções: aplicar selfblast e relatar singletons, genes sem nenhum “hit”, também foram selecionadas. O diagrama de Venn dos COGs compartilhados entre os cianófagos foi calculado e desenhado com a ajuda da ferramenta Venn Diagram da Bioinformatics Evolutionary Genomics, utilizando como input os arquivos com os COGs preditos pelo ProteinOrtho. As análises de sintenia dos genomas completos foram performadas no programa Mauve. A construção da árvore filogenética foi feita a partir do genoma completo. Inicialmente, os genomas foram alinhados usando o MAFFT versão 7. Em seguida, as lacunas, ou *gaps*, foram removidos com o auxílio da ferramenta trimAl, os parâmetros usados foram *gaphreshold* de 0.9 e porcentagem mínima das posições no alinhamento original a conservar foi de 60. Por fim, a árvore propriamente dita foi gerada com o programa IQ-TREE (método de máxima verossimilhança e *bootstrap* de 1000), e visualizada e editada usando a ferramenta online iTOL. Além dos genomas dos cianófagos que infectam *Microcystis*, foram inseridos na árvore três outros genomas de bacteriófagos da ordem *Caudovirales* [Bacteriophage Lily, do gênero *Lilyvirus* (Genbank ID: NC_028841.1); Escherichia phage vB_EcoS_AKFV33, da família *Demerecviridae* (Genbank ID: NC_017969.1); Caulobacter phage CcrBL10, da família *Siphoviridae* (Genbank ID: NC_048045.1)] (QIAN *et al.*, 2022). Estes genomas foram inseridos para avaliar se os cianófagos que infectam *Microcystis* se agrupam em um só clado de acordo com a espécie do hospedeiro infectado (como acontece com os chlorovírus) deixando os demais fagos em outros clados (QIAN *et al.*, 2022).

4.6. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para cianófagos

Os ensaios descritos a seguir foram realizados utilizando culturas de células de *Microcystis aeruginosa*.

4.6.1. Tissue Culture Infectious Dose (TCID50)

Foi feito ensaio de TCID50 utilizando uma amostra ambiental enriquecida por várias passagens em células denominada 7S, o qual causou estiolamento das células de *Microcystis* na etapa de prospecção em meio líquido. Foi utilizada para este ensaio uma placa de 96 poços, na qual as duas primeiras colunas eram os controles celulares (contendo 100 µL de meio BBM e 100 µL de células, totalizando $2,4 \times 10^6$ células por poço). As colunas subsequentes continham o mesmo volume e quantidade de células e 100 µL de amostras. As amostras utilizadas foram diluídas (diluições de 10^{-1} a 10^{-10}) e em cada coluna foram feitas 8 replicatas da mesma diluição. Para validar este método, foi realizado um ensaio utilizando estoques virais de PBCV-1 e como hospedeiros *Chlorella variabilis* NC64A. Para realizar os cálculos dos títulos virais a partir do ensaio de TCID50, foi utilizado o cálculo *Reed & Munch endpoint calculation method* (1938): 1) Calculou-se o percentual de poços nos quais foram observados indicativos de efeitos citopáticos, doravante chamados de poços positivos de cada coluna/diluição (total de poços positivos/número total de poços utilizados para a diluição*100%). Em caso de contaminação observada em algum poço o mesmo foi desconsiderado. 2) A primeira diluição cujo percentual foi maior que 50% e a diluição subsequente foram selecionadas, chamadas aqui de “a” e “b”, para realização do cálculo da “distância proporcional”, ou PD. $PD = [(\% \text{ de poços positivos em a}) - 50\%] / [(\% \text{ de poços positivos em a}) - (\% \text{ de poços positivos em b})]$. 3) O cálculo de TCID50 foi realizado utilizando a fórmula: $\log ID_{50} = \log(\text{diluição com } > 50\% \text{ de positivos}) + PD \times [-\log(\text{fator de diluição})]$.

4.7. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para vírus que infectam clorelas

Os ensaios descritos a seguir foram realizados utilizando culturas de células de *Chlorella vulgaris*.

4.7.1. Ensaio de placa - *Chlorella vulgaris*

Conforme descrito acima, foram feitos ensaios de placa empregando o método *Double-Layer*, células *Chlorella vulgaris* MG e amostras da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Onça. As placas foram incubadas em incubadora a 25°C sob luz constante, e foram observadas após 2, 4 e 6, 8, 10 e 15 d.p.i. As amostras previamente enriquecidas e as demais foram clarificadas (centrifugadas a 4000 xg por 10 minutos em centrífuga digital) antes de serem utilizadas nos ensaios de placa, sendo utilizados apenas os sobrenadantes das amostras.

4.7.2. Purificação das placas de lise

As placas de lise resultantes do ensaio descrito acima foram recortadas do soft BBM-ágar 0,75% com uma ponteira descartável plástica de 100 μ L e colocadas em microtubos de 1,5 mL contendo meio BBM. O microtubo foi agitado empregando o agitador de tubos vortex até a dissolução do ágar. Em seguida foi realizada a etapa de centrifugação (10.000 xg por 2 minutos), seguida de coleta do sobrenadante e transferência para um microtubo de 1,5 mL. O sobrenadante foi coletado para realizar etapa de expansão às cegas (descrita no tópico abaixo). A partir disso foi realizado um novo ensaio de placa conforme descrito acima. Novamente as placas de lise foram coletadas e utilizadas para nova etapa de expansão às cegas. Todo este processo foi repetido mais uma vez, totalizando três passagens, e com esta amostra expandida final, foi realizada uma titulação do estoque viral por ensaio de placas.

4.7.3. Produção de estoques virais

As primeiras placas de lise observadas em placas de Petri a partir de amostras clarificadas da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Onça foram recortadas e utilizadas para experimento de expansão às cegas. Neste trabalho, foi chamada de expansão às cegas, as etapas de infecção em meio líquido nas quais a multiplicidade de infecção (M.O.I.) não era conhecida. Para as rodadas de expansão às cegas, foram colocados em um tubo falcon: 1 mL de um concentrado de células ($6,7 \times 10^7$ células/tubo), 4 mL de meio BBM e 100 μ L da amostra. O tubo falcon foi colocado em incubadora shaker por 3 horas a 100 rpm, depois colocado na incubadora refrigerada por quatro dias sob luz constante a 25°C. Cabe ressaltar que este protocolo foi alterado após a percepção de que os títulos dos isolados eram sempre pequenos (10^2 a 10^4 UFP/mL), aumentando, assim, o volume de amostra utilizado, o qual passou a ser 1 mL para que a proporção células/partículas virais ficasse mais equilibrada.

Com as soluções estoque dos isolados tituladas, foram testados dois protocolos para produção/expansão viral: no primeiro, foram colocados 4,5 mL de meio BBM em um tubo falcon de 15mL, um volume de cultura de células (previamente contadas) e um volume de solução estoque viral (já titulada) visando atingir uma M.O.I. de 0,001. Os tubos ficaram 4 horas na incubadora shaker, e depois foram transferidos para a incubadora refrigerada, onde ficaram por 4 dias sob luz constante a 25°C. De maneira geral as células de microalgas tendem a decantar no tubo falcon, dificultando assim a probabilidade de uma infecção acontecer. Visando promover o encontro das partículas virais em suspensão e das células hospedeiras decantadas, um novo protocolo no qual o tempo em que a amostra está sob agitação na incubadora shaker foi aumentado para dois dias e o tempo de incubação em

incubadora refrigerada foi diminuído para três dias. Além disso, a multiplicidade de infecção M.O.I., foi aumentada para 0,01.

4.7.4. Purificação viral

Uma tentativa de purificar o isolado 127 foi performada. A primeira etapa, visando promover a lise celular, foi executada. Diferentes estoques do isolado foram centrifugados ($4000 \times g$ durante 10 min). Os sobrenadantes foram coletados e os pellets foram macerados para obter os lisados de células. Para tal, o pellet foi ressuscitado em 14 mL de PBS. Os lisados celulares foram obtidos após maceração feita com Homogeneizador Douncer (macerados 100 vezes), e foram novamente centrifugados a $4000 \times g$ durante 10 min. Os sobrenadantes foram misturados aos sobrenadantes obtidos previamente, e os pellets foram descartados. As misturas dos sobrenadantes foram filtradas em filtro de seringa 0,45 de micrômetros. Para a segunda etapa, de purificação, foi necessário preparar uma solução de sacarose a 25%. Dez mL da solução de sacarose foi colocada em um tubo para ultracentrifugação, em seguida cerca de 25 mL da amostra filtrada, essa etapa foi repetida para cada uma das amostras. Os tubos foram pesados na balança, foi avaliado se o peso de todos os tubos era igual, para evitar que a ultracentrífuga de solo da marca *Sorvall* ficasse desbalanceada. Procedeu-se com a ultracentrifugação a 4 °C, 36.000 xg por 2 h. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram ressuscitados em 250 µL de solução de estabilidade viral (200 mL de água ultrapura (*MilliQ*), 1,56g de Tris-HCl e 0,406g de $MgCl_2$, pH 7,8) (DUNIGAN *et al.*, 2019; DE SOUZA *et al.*, 2020; DORNAS *et al.*, 2016).

4.7.5. Ensaio piloto de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR)

Um ensaio piloto de reação em cadeia da polimerase em tempo real, qPCR, foi executado da seguinte maneira: utilizando o *Kit Roche - High Pure Viral Nucleic Acid*, foi realizada a extração de DNA de células infectadas. Foram preparadas 4 reações, e para cada reação foram utilizados 200 µL de *binding buffer*, 0,4 µL de poly(A), 50 µL de proteinase K e 200 µL da amostra. Cada tubo contendo amostra e reagentes foi agitado em agitador vórtex, e levado a um termobloco, onde foram incubados a 72°C por 10 minutos. Foram preparadas e identificadas as colunas e tubos coletores, nas quais foram adicionadas as amostras, com os reagentes, adicionados de 100 µL de *Binding Buffer*. Em seguida foi executada uma centrifugação por 1 minuto a 8.000 xg; O líquido que caiu sobre o tubo coletor foi descartado e o tubo coletor substituído. À coluna foram inseridos 500 µL de *Inhibitor Removal Buffer*, e foram centrifugadas por 1 minuto a 8.000 xg. Novamente o líquido foi descartado e o tubo

coletor substituído. À coluna foram adicionados 450 μL de *Wash Buffer* e centrifugados por 1 minuto a 8.000 xg, o líquido foi descartado e o tubo coletor trocado, esta etapa de lavagem com o *Wash Buffer* foi repetida. A coluna foi alocada em tubo de 1,5 mL devidamente identificado para eluição do DNA. 50 μL de *Elution Buffer* foram adicionados e a amostra incubada por 10 minutos à temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 1 minuto a 8.000 xg. Dois μL do DNA já extraído foram adicionados à um tubo próprio para reação de PCR, junto de cerca de 10 μL de SYBR *Green*, 6,4 μL de água livre de nucleases, 0,8 μL de primer forward e 0,8 μL de primer reverse. Os tubos foram colocados em uma máquina de PCR Step One™ System, e uma corrida foi iniciada. Após o término da corrida, os plots e dados da corrida foram salvos e os tubos descartados. Foram feitas quatro reações: um branco (sem DNA) e uma amostra (contendo o DNA extraído), cujos primers (**Tabela 3**) têm como alvo o gene da DNA polimerase do PBCV-1; um branco (sem DNA) e uma amostra: cujos primers têm como alvo o gene da proteína principal do capsídeo do CV-XW01.

Tabela 3 – Sequência dos primers utilizados no ensaio piloto de qPCR

DNA polimerase de PBCV-1	Proteína principal do capsídeo de CV-XW01
Primer forward: 5'- GTG GAA GTC CTA CCT GGG TC -3'	Primer forward: 5'- GCG GTC AAG CAG TAC CAT CT- 3'
Primer reverse: 5'- TCG GTG CTC GGA AAT CCT TC -3'	Primer reverse: 5'- GTG TTG AGC TTG GGC GAA TC -3'

Fonte: Elaborado pela autora.

4.7.6. Titulação viral

Os ensaios de titulação viral foram feitos em placa de 6 poços e em placa de Petri.

Foram preparadas placas de 6 poços conforme descrito em “Método *Double-Layer*”, porém, foram utilizadas amostras diluídas (nas diluições de 10^{-2} a 10^{-6}) em meio BBM. As placas foram acondicionadas em incubadora refrigerada sob luz constante a 4°C, e foram lidas após 4 dias.

Em placas de Petri, os ensaios de placa foram feitos conforme descrito em “Método *Double-Layer*”, porém, foram utilizados 900 μL de amostras diluídas (nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} e 10^{-3}). As placas que resultaram em um número de placas de lise entre 30 e 300 (quando este número de placas foi observado), foram utilizadas para realização dos cálculos. O cálculo é realizado da seguinte forma: o número de placas contadas no poço selecionado é multiplicado pelo inverso da diluição, e em seguida, o resultado é multiplicado por (1000/volume usado na inoculação), o resultado desta equação revelará o número de unidades

formadoras de placa (UFP) por mL. Nos controles celulares sempre são utilizados os meios usados no cultivo das células.

Para validar o protocolo, soluções estoque de PBCV-1 foram utilizadas. O protocolo utilizado foi o supracitado, no entanto, foram usadas culturas de células *Chlorella variabilis* NC64A, e as diluições utilizadas nos experimentos foram 10^{-6} e 10^{-8} .

4.7.7. Avaliação da estabilidade viral

Para avaliar a estabilidade do isolado 127 frente ao congelamento, um estoque deste isolado não titulado, mas que sabidamente causava placas de lise quando submetido ao ensaio de placa, foi utilizado. A solução estoque viral foi agitada em agitador vórtex. Em seguida, a solução estoque foi submetida a três rodadas de congelamento/descongelamento. A solução foi clarificada (centrifugada em centrífuga digital a 4000 xg por 10 minutos), e 1 mL do sobrenadante foi coletado e plaqueado. O protocolo padronizado para ensaio de placa (método *double-layer*) foi utilizado, e para o controle celular, foi utilizado 1 mL de meio BBM. Como controle positivo, foram utilizados 900 μ L de um estoque do isolado 127 que não sofreu congelamento no ensaio de placa.

4.8. Caracterização dos efeitos citopáticos: microscopia óptica

Para caracterizar os efeitos citopáticos dos isolados nas células, as células decantadas no fundo dos tubos falcon resultantes das etapas de produção do estoque viral (etapas de expansão) foram coletadas, e ressuspensas em 1 mL de PBS. A etapa que seguinte foi a de centrifugação das amostras, as quais foram centrifugadas a 8000 xg por pelo menos 2 minutos ou até a observação da formação de um pellet de células. 10 μ L desse pellet foram coletados e colocados sobre uma lâmina, e a gotícula do pellet foi posteriormente coberta por uma lamínula e analisadas em microscópio óptico sob lentes objetivas de 4x, 10x e 100x.

4.9. Caracterização dos efeitos citopáticos: microscopia eletrônica de transmissão

Primeiramente foram realizados experimentos para definir o melhor protocolo de preparo de amostras usando a amostra 127 e células de *Chlorella vulgaris*, os quais serão descritos a seguir. O ponto de partida desses experimentos, foram 3 erlenmeyers contendo cada um 50 mL de amostras preparadas partindo de uma M.O.I. de 0,01, foram testadas 3 diferentes condições de infecção (1) 3 dias na incubadora shaker (100 rpm); (2) 4 dias no incubadora shaker e um na incubadora refrigerada; (3) 4 dias no incubadora shaker e 3 na incubadora refrigerada) (**Tabela 4**). Após o tempo de infecção pré-estabelecido, as amostras foram

homogeneizadas em agitador vórtex e depois centrifugadas a 4000 xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado. O pellet de células foi ressuspenso em 1,5 mL de Reagente de Karnovsky. Os microtubos contendo o pellet de células e o Reagente de Karnovsky foram colocados no banho ultrassônico (CHO *et al.*, 2002). Foram testados três diferentes tempos no banho ultrassônico: 50 segundos totais (sendo 17 segundos no banho seguidos de 17 segundos de pausa, repetindo mais duas vezes esse processo); 1 minuto e 30 segundos totais no banho ultrassônico (sendo 30 segundos no banho seguidos de 30 segundos de pausa, repetindo mais duas vezes esse processo); e, por fim, 5 minutos totais no banho ultrassônico (sendo 1 minuto e 40 segundos no banho seguidos de um minuto e 40 segundos de pausa, repetindo mais duas vezes esse processo); Foram testados, também, quatro diferentes tempos de fixação: 4h, 16h, 24h e 48h. Durante o tempo de fixação, os microtubos ficaram em agitador orbital. Passado o tempo de fixação, as amostras foram centrifugadas 8000 xg por 2 minutos até a formação do pellet. O fixador foi retirado e os pellets lavados 3 vezes (fazendo 5 minutos de pausa entre as lavagens) com tampão fosfato 0,1M pH 7,3. Preparo do tampão fosfato: 2,76 g de fosfato monossódico adicionados a 100 ml de água destilada para obter a solução A; 5,66 g de fosfato dibásico adicionados em 100 ml de água destilada para obter a solução B; adicionados 23 ml da solução A e 77 ml da solução B, para obter o tampão fosfato de sódio a 0,2M pH 7,3, o qual foi posteriormente diluído 2X em água destilada para obtenção do tampão fosfato de sódio a 0,1M pH 7,3. A solução foi filtrada em membranas de 0.22 µm para esterilização. Após as etapas de preparo supracitadas, os pellets foram enviados para o Centro de Microscopia da UFMG, onde foram pós-fixados com tetróxido de ósmio, embebidos em resina, seccionados e contrastados. O material foi analisado no Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2- 12- SpiritBiotwin FEI – 120 kV.

Tabela 4 – Resumo das diferentes amostras preparadas

Código	Descrição da amostra	Observações	Código	Descrição da amostra	Observações
A34	Amostra 3 dias pós infecção, 4 horas de fixação	Pellet muito pequeno 5' no banho ultrassônico	C548	Controle 5 dias no shaker, 48 horas de fixação	50' totais no banho ultrassônico
A316	Amostra 3 dias pós infecção, 16 horas de fixação	Pellet muito pequeno 5' no banho ultrassônico	A74	Amostra 7 dias pós infecção, 4 horas de fixação	50' totais no banho ultrassônico
A324	Amostra 3 dias pós infecção, 24 horas de fixação	Pellet muito pequeno 5' no banho ultrassônico	A716	Amostra 7 dias pós infecção, 16 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico Pellet muito pequeno
C34	Controle 3 dias no shaker, 4 horas de fixação	5' no banho ultrassônico	A724	Amostra 7 dias pós infecção, 24 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico
C316	Controle 3 dias no shaker, 16 horas de fixação	5' no banho ultrassônico	C74	Controle 7 dias no shaker, 4 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico
C324	Controle 3 dias no shaker, 24 horas de fixação	5' no banho ultrassônico	C716	Controle 7 dias no shaker, 16 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico
A54	Amostra 5 dias pós infecção, 4 horas de fixação	50' totais no banho ultrassônico	C724	Controle 7 dias no shaker, 24 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico
A548	Amostra 5 dias pós infecção, 48 horas de fixação	50' totais no banho ultrassônico	A04	Amostra 127 (às cegas) 4 horas de fixação	Pellet foi perdido 1'30' totais no banho ultrassônico
C54	Controle 5 dias no shaker, 4 horas de fixação	50' totais no banho ultrassônico	A016	Amostra 127 (às cegas) 16 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico Pellet muito pequeno
A024	Amostra 127 (às cegas) 24 horas de fixação	1'30' totais no banho ultrassônico Pellet foi perdido			

Fonte: Elaborado pela autora.

As amostras escolhidas e enviadas para o Centro de Microscopia da UFMG foram as C34, C548, A548, A54, A724, A016 (amostra “às cegas”: estoque do isolado 127 o qual não foi titulado, mas sabidamente formava placas de lise).

Padronizado o protocolo de preparo das amostras, este foi utilizado para preparo de outras amostras: *Microcystis aeruginosa* infectada com os isolados 7s e 5i, *Chlorella variabilis* NC64A controle e infectada pelo PBCV-1 (1×10^2 UFP/mL), *Chlorella vulgaris* infectada com os isolados 127 e 12. Para a infecção foram usados 1 mL de células ($6,7 \times 10^7$ células/mL), 1 mL de amostra e 4 mL de meio. O protocolo escolhido para a fixação destas amostras foi o que preconiza 4 horas de fixação. O tempo no banho ultrassônico serve para promover a penetrabilidade do fixador nas células, uma vez que microalgas e cianobactérias possuem paredes celulares as quais dificultam a penetração do fixador. O tempo selecionado foi de 1 minuto e 30 segundos totais no banho. As amostras foram fixadas e enviadas ao Centro de Microscopia da UFMG conforme supracitado.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias

Para compreender o perfil de crescimento de cada uma das espécies de microalgas e cianobactérias sob as condições de cultivos adotadas, foram feitas curvas de crescimento das células, as quais nos auxiliam a compreender, principalmente, qual a melhor fase para utilizar as células nos experimentos. A primeira curva de crescimento a ser performada, foi a curva de *Chlorella vulgaris* MG (**Figura 22**). Nesta curva é possível ver a fase lag, ou fase de latência, acontecendo entre os dias 0 e 3, onde ocorre a adaptação das células ao meio. Sendo assim, a inclinação da reta neste período é reduzida, indicando que o crescimento celular ocorre de maneira mais lenta. A fase de crescimento exponencial, ou fase log, que acontece entre os dias 3 e 5, é quando as células estão se multiplicando muito rapidamente e, desta forma, a inclinação da reta neste período é acentuada. Este é o período ideal para se utilizar as culturas de células nos experimentos. Entre os dias 5 e 7 ocorre a fase estacionária, na qual a inclinação da reta é a menor possível. Nesta fase, o número de células novas e o número de células que estão morrendo é similar, de modo que a quantidade de células se mantém estável no meio. Nesta etapa, os nutrientes disponíveis no meio tornam-se mais escassos, pois foram utilizados pelas células mais antigas, fazendo com que a taxa de morte celular seja aumentada. Em curvas de crescimento bacterianas, após a fase estacionária, é observada uma nova fase, denominada de declínio, na qual as células morrem devido à falta de nutrientes disponíveis (ROBAZZA *et al.*, 2010). Na curva de crescimento de *Chlorella vulgaris*, esta fase não acontece, e uma nova fase exponencial é observada entre os dias 7 e 11. Uma das possíveis explicações para a observação deste resultado baseia-se na capacidade destas células de usarem materiais orgânicos, sobretudo glicose, como fonte de energia. Por apresentarem crescimento heterotrófico e/ou mixotrófico, estas células podem estar usando os restos celulares liberados no meio pelas *Chlorellas* mortas como substrato (SAFI *et al.*, 2014). Esta segunda fase exponencial, é seguida por uma nova fase estacionária (redução da inclinação da reta entre os dias 11 e 14), na qual os nutrientes fornecidos pelas células mortas é consumido pelas demais, e a limitação de nutriente faz com que novamente as células morram e liberem conteúdo celular no meio, o que será novamente usado como substrato pelas células vivas (aumento da inclinação da reta observado entre os dias 14 e 17).

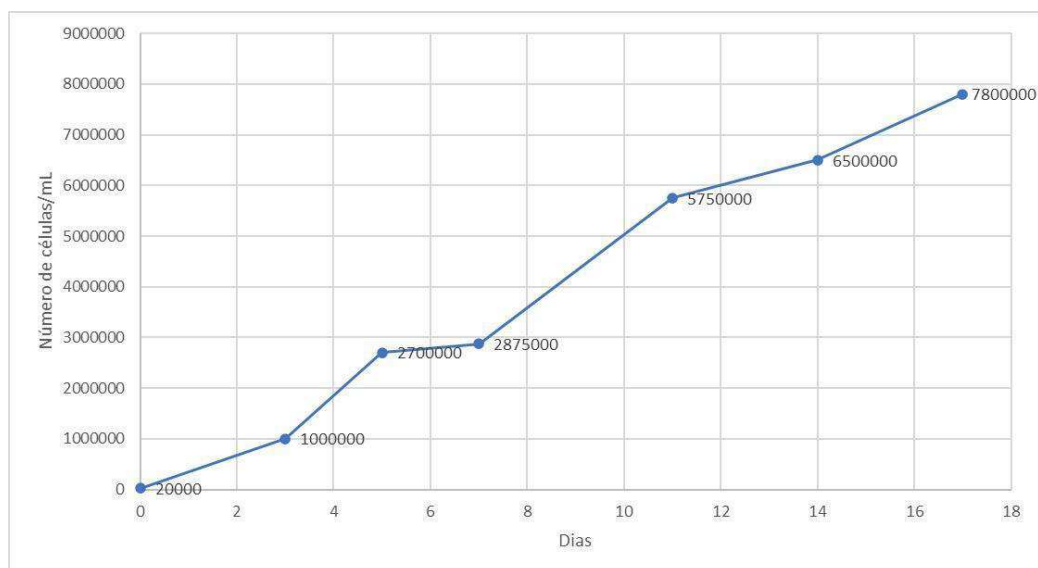


Figura 22 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* MG. Curva de crescimento das células de *Chlorella vulgaris* MG em meio BBM sem adição de antimicrobianos.

Quando analisamos a curva de crescimento de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3, um perfil diferente é observado (**Figura 23**). Entre os dias 0 e 4, ocorre um discreto crescimento das células, caracterizado pela inclinação da reta quase nula que é observada. Este aumento de dez vezes na quantidade de células, é percebido como discreto quando se considera a natureza das clorélas, as quais são células que se replicam muito rapidamente por meio de autósporos, podendo uma única célula dar origem a diversas outras células por vez. Um crescimento ainda discreto é observado até o dia 6, podendo ser considerada ainda fase lag. Entre os dias 6 e 14 é observado um crescimento notável das células (caracterizado pela inclinação aumentada das retas), sendo esta a fase de crescimento exponencial. Este é o período ideal para realização de experimentos utilizando estas células. Logo em seguida (dias 14 a 18), a inclinação da reta sofre uma queda, indicando que pode ser o início de uma fase estacionária. É importante mencionar que, quando se parte de inóculos pequenos, como no caso desta curva de crescimento, são observadas nas culturas muitas *ghost cells*, as quais são células sem clorofila, sendo assim esbranquiçadas (AGARKOVA *et al.*, 2014). O aparecimento destas células dificulta a contagem em câmara de Neubauer, uma vez que as microalgas têm um tamanho diminuto, sendo a cor verde fundamental para sua visualização sob o microscópio. Além disso, são observados aglomerados de células nas culturas de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3, o que também dificulta a contagem em câmara de Neubauer.

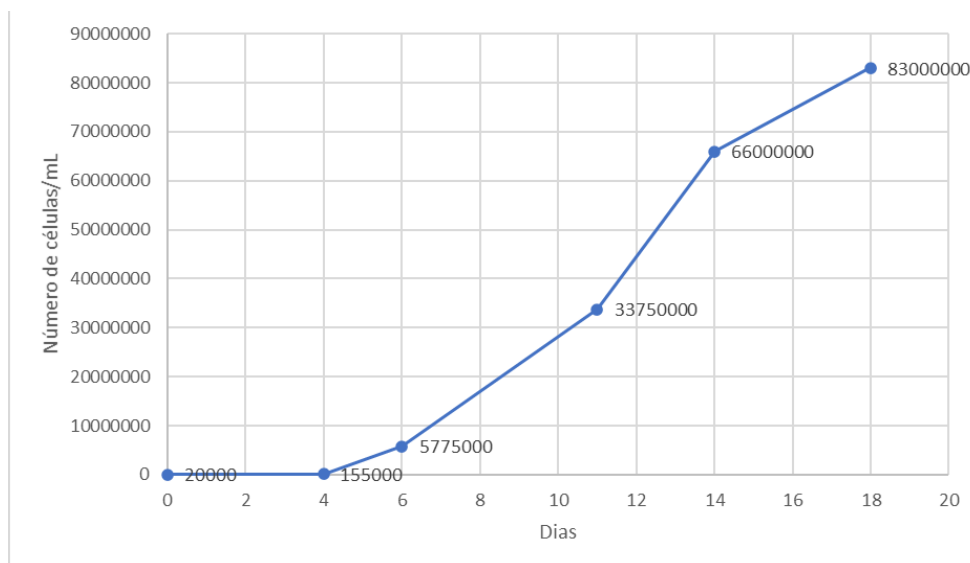


Figura 23 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* Syngen 2-3. Curva de crescimento das células de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 em meio MBBM sem adição de antimicrobianos.

O perfil da curva de crescimento de *Chlorella vulgaris* SC (**Figura 24**) observado foi diferente do esperado. Imagina-se que o perfil da curva de crescimento de uma mesma espécie seja similar, no entanto, não é isto que é evidenciado pelo gráfico abaixo. Entre os dias 0 e 4 há um discreto crescimento das células, sendo a inclinação da curva nessa fase, lag, reduzida. Dos dias 4 a 6, a inclinação da reta aumenta consideravelmente, sendo assim a fase log. Esta é, portanto, a melhor fase para se usar as células em experimentos. Em seguida, dias 6-18, é possível observar redução na inclinação das retas, no entanto, não é observado um platô, característico da fase estacionária. A contagem do dia 16 foi desconsiderada para a plotagem deste gráfico, uma vez que foi considerado um outlier. Este ponto representa uma queda muito brusca no número de células, o que é improvável de ter acontecido na cultura, uma vez que o ponto anterior e o ponto subsequente seguem uma sequência lógica, na qual o número de células cresce gradativamente. Se este ponto fosse considerado entre os dias 11 e 16, seria observada uma fase de morte celular (com o módulo da inclinação da reta sendo muito grande) seguida de uma fase log (com uma inclinação da reta também muito grande). Estas células formam muitos grumos observáveis, o que dificulta demasiadamente a contagem em câmara de Neubauer, e provavelmente por esse motivo, foi observada uma contagem de células que não seguiu um padrão (outlier).

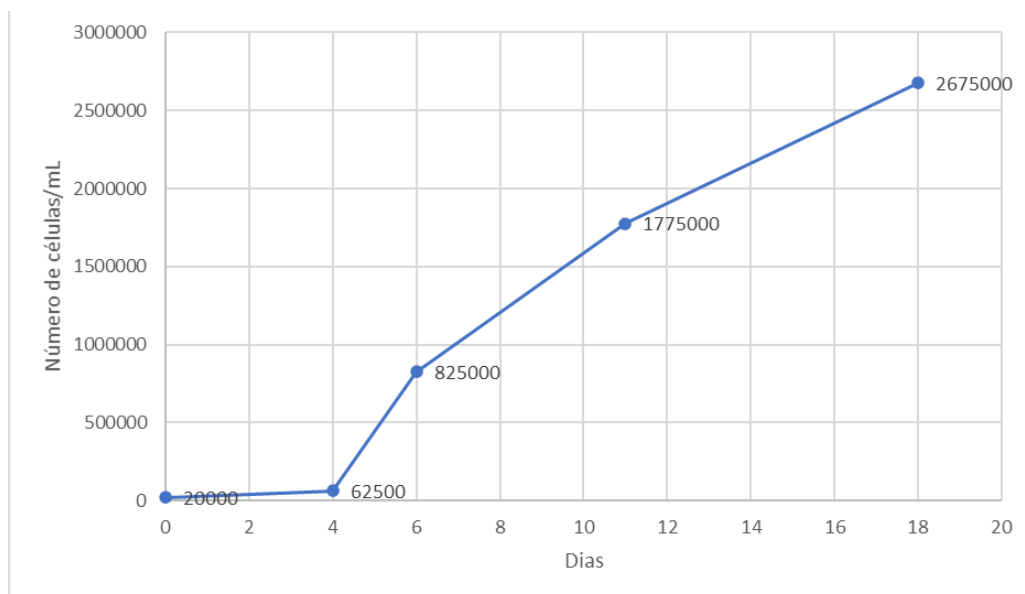


Figura 24 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* SC. Curva de crescimento das células de *Chlorella vulgaris* SC em meio BBM sem adição de antimicrobianos.

Assim como as *Chlorella vulgaris* de São Carlos, as *Chlorella minutissima* formam aglomerados de células observáveis que dificultam a sua contagem na Câmara de Neubauer. Inicialmente na curva de crescimento (**Figura 25**), entre os dias 0 e 3, é observado uma diminuição no número de células, que pode ter sido causada por algum erro de contagem, devido a dificuldade de realizar a contagem das células, ou realmente houve morte celular neste período por algum motivo não identificado. Dos dias 3 ao 5, é observado um discreto aumento no número de células (evidenciado pela inclinação da reta), sendo esta a fase lag. Em seguida, é observado um crescimento exponencial das células sustentado até o dia 12. Sendo o período entre os dias 5 e 12, o melhor para realizar experimentos com as células desta espécie.

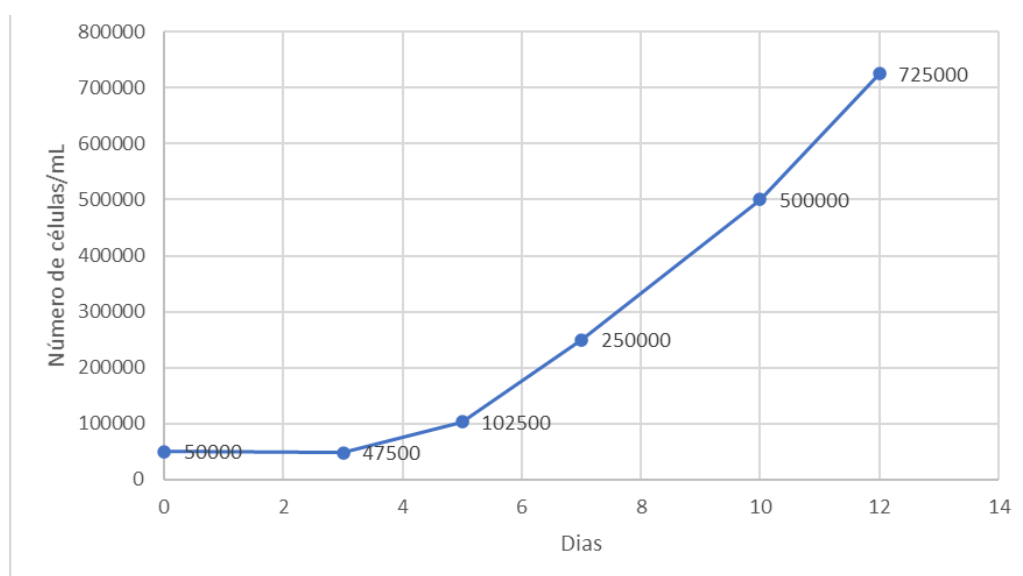


Figura 25 – Curva de crescimento: *Chlorella minutissima*. Curva de crescimento das células de *Chlorella minutissima* em meio BBM sem adição de antimicrobianos.

5.2. Curvas de crescimento das algas e cianobactérias cultivadas em meio contendo antimicrobiano

Visando obter culturas axênicas, a tetraciclina, único antimicrobiano que pode ser empregado no cultivo de microalgas deve ser utilizado no meio de cultura, e para avaliar os efeitos da tetraciclina sobre o crescimento das células, curvas de crescimento foram realizadas nas culturas celulares contendo este fármaco a uma concentração de 10 µg/mL. Na curva de crescimento da cultura de *Chlorella variabilis* NC64A com tetraciclina, observamos inicialmente uma fase lag, de adaptação das células, dias 0 a 3. Seguida de uma fase exponencial, que dura do dia 3 ao dia 7. Em seguida é observada uma diminuição do ritmo de crescimento das células (diminuição da inclinação da reta), dias 7-12 (**Figura 26**).

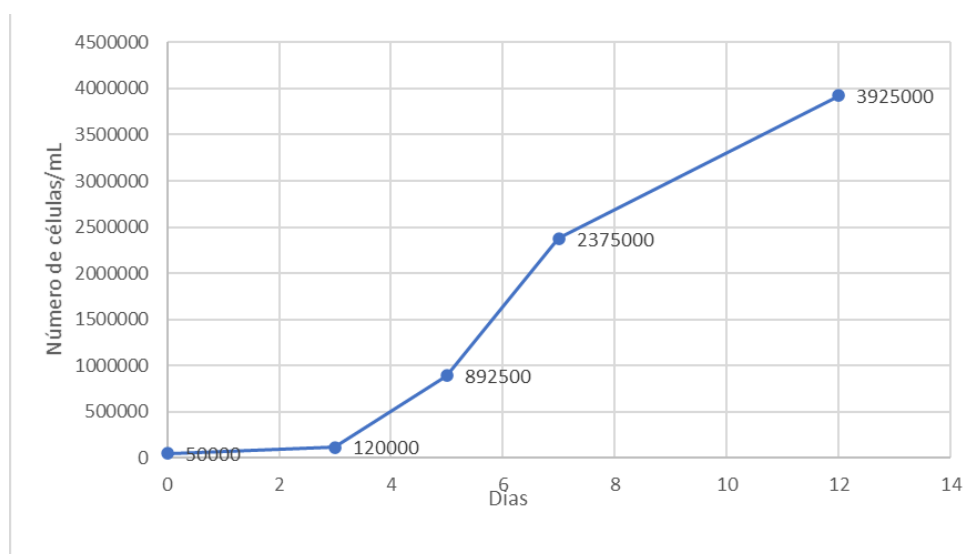


Figura 26 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* NC64A - Cultivo com antimicrobiano. Curva de crescimento das células de *Chlorella variabilis* NC64A em meio MBBM com adição de antimicrobianos.

Ao comparar a curva de crescimento exibida acima (**Figura 26**), com a curva de crescimento das células de *Chlorella variabilis* NC64A cultivadas sem tetraciclina (**Figura 27**, linha verde escura), é possível perceber algumas pequenas diferenças. Enquanto na curva de crescimento das células cultivadas com antimicrobianos não são observados platôs, na curva padrão (**Figura 27**) é observada uma fase estacionária entre os dias 6 e 7, apresentando um perfil bem similar ao observado na **Figura 22**. As fases exponenciais da curva feita sem

antimicrobiano acontecem entre os dias 4-6 e 7-9, enquanto na primeira curva acontece mais precocemente, entre os dias 3-7. Na fase exponencial das células cultivadas sem antimicrobianos, entre os dias 5 e 6, a quantidade de células aumenta cerca de 2,5 vezes, enquanto na fase exponencial das células cultivadas com antimicrobiano, é observado aumento de cerca de 2,5 vezes na quantidade de células entre os dias 5 e 7, um dia a mais, representando assim um retardamento discreto no crescimento das células. Este resultado, entretanto, não corrobora para a suspensão do uso de antimicrobianos, uma vez que o meio MBBM é rico em compostos orgânicos que favorecem o crescimento exacerbado de bactérias, sendo, portanto, fundamental para o cultivo destas células.

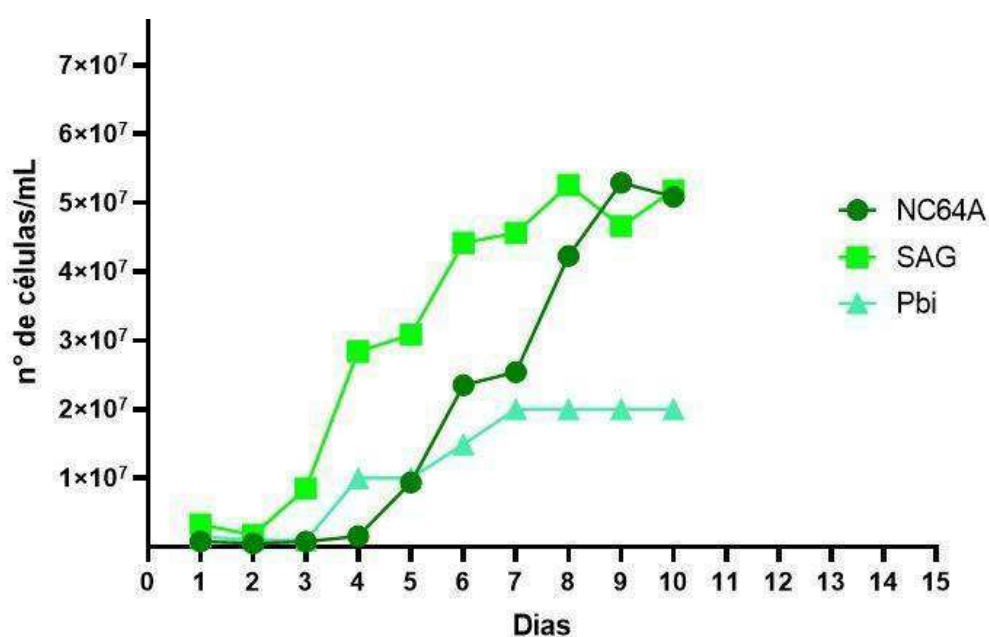


Figura 27 – Curva de crescimento: *Chlorella variabilis* NC64A. Curva de crescimento das células de *Chlorella variabilis* NC64A em meio MBBM sem adição de antimicrobianos. Esta curva de crescimento foi feita por outra aluna do grupo, Sara Arêdes, e é utilizada como padrão pelo grupo Gephy.

Quando comparamos as curvas de crescimento de *Chlorella vulgaris* MG, no entanto, é possível observar uma grande diferença nos perfis das curvas. Na curva feita com cultura sem antimicrobiano, o aumento no número de células do dia 0 ao dia 12 é de quase 300 vezes, enquanto o aumento no número de células observado na curva de crescimento feita com cultura contendo tetraciclina (**Figura 28**) no mesmo período foi de apenas 36 vezes, ou seja, as células cresceram muito menos. Além disso, houve uma dilatação no tempo necessário para as células atingirem a fase exponencial de crescimento, sendo a fase lag aumentada (dos dias

0-10). É possível concluir, portanto, que o uso de antimicrobianos não é indicado para estas células. Considerando, também, que as *Chlorella vulgaris* são cultivadas em meio BBM, que contém apenas sais, sendo assim um meio que não favorece o crescimento de microrganismos, o uso de antimicrobianos seria dispensável neste caso.

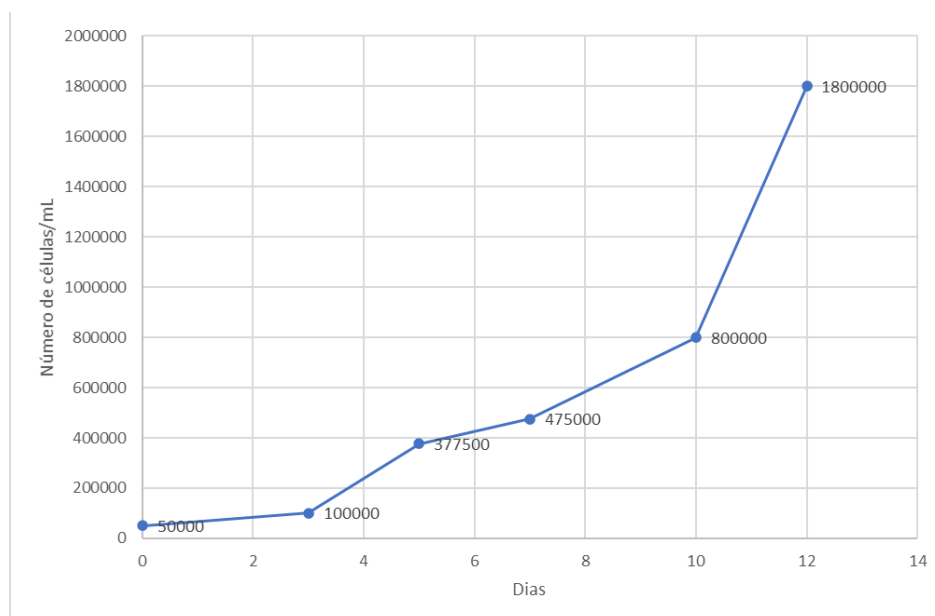


Figura 28 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* MG - Cultivo com antimicrobiano. Curva de crescimento das células de *Chlorella vulgaris* MG em meio BBM com adição de antimicrobianos.

Ao submeter a curva de crescimento da cultura de *Chlorella vulgaris* SC na presença de antimicrobianos (**Figura 29**) a uma análise, é possível perceber um perfil levemente similar ao observado para *Chlorella vulgaris* MG (**Figura 22**), no qual há, logo após a fase estacionária (dias 5-7), o aparecimento de uma segunda fase log (dias 7-10). A primeira fase log é observada entre os dias 3 e 5. Na primeira parte da curva (dias 0-3), é observada uma diminuição de 50% no número de células, essa redução inicial também foi observada na **Figura 25**, e, neste caso, pode também ter sido causada por algum erro na contagem (também há a formação de grumos celulares), ou as células suscetíveis ao antimicrobiano morreram. Quando comparada à curva de crescimento da cultura de *Chlorella vulgaris* SC cultivada sem antimicrobianos (**Figura 24**), nota-se o crescimento celular também foi significativamente reduzido na cultura que havia tetraciclina, sendo o aumento no número de células no período dos dias 0-12 cerca de 92 vezes na primeira e cerca de 10,5 vezes na segunda. É evidente, que assim como nas culturas de *Chlorella vulgaris* MG, o uso de antimicrobianos não também não é indicado para o cultivo de *Chlorella vulgaris* SC (cujo meio de cultivo também é BBM).

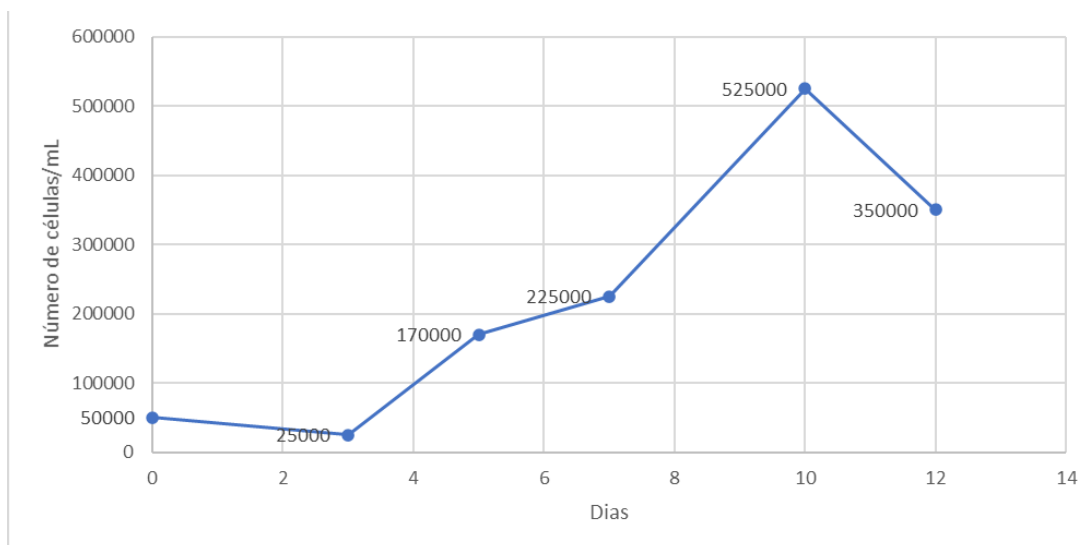


Figura 29 – Curva de crescimento: *Chlorella vulgaris* SC - Cultivo com antimicrobiano. Curva de crescimento das células de *Chlorella vulgaris* SC em meio BBM com adição de antimicrobianos.

A curva de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 cultivada com o antimicrobiano não foi concluída, pois logo nos primeiros dias, muitas *ghost cells* foram visualizadas. Já no terceiro dia, não foi possível observar células normais, apenas *ghost cells*, deixando a cultura completamente esbranquiçada (**Figura 30**). A partir de inóculos pequenos, sempre são observadas muitas *ghost cells* nas culturas de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3. Estas células, no entanto, são cultivadas em meio MBBM, que é altamente propenso à contaminação, e por esse motivo, o cultivo destas células é feito com antimicrobiano independente dos resultados das curvas de crescimento. Nos subcultivos, geralmente não há aparecimento de *ghost cells* quando as proporções padronizadas são respeitadas.

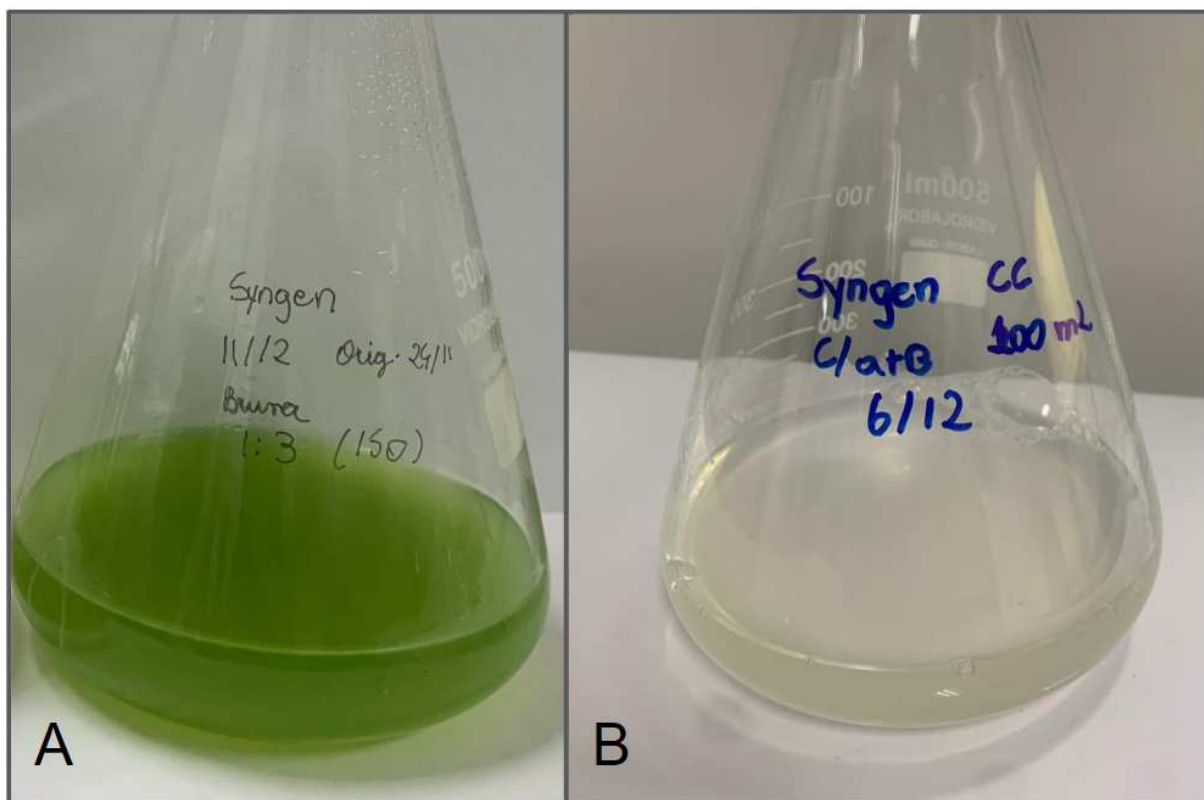


Figura 30 – Efeito de *ghost cells* sobre a cultura. Em A: uma cultura típica de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 de coloração esverdeada. Em B: cultura de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 esbranquiçada devido ao surgimento de *ghost cells*.

Ao compararmos as curvas de crescimento de culturas de *Chlorella minutissima* cultivada sem (**Figura 25**) e com (**Figura 31**) tetraciclina, é possível perceber que o aumento no número de células total dos dias 0-10 não é tão discrepante, sendo de 10 vezes na primeira e 8,5 vezes na segunda. No entanto, enquanto na cultura sem antimicrobianos o número de células/mL segue aumentando entre os dias 10-12, na cultura com antimicrobianos ocorre uma queda significativa no número de células. Como esta célula é cultivada em meio BBM, que é pouco suscetível à contaminação, o uso de antimicrobianos também não é recomendado. Na curva de *Chlorella minutissima* cultivada com tetraciclina é possível observar uma fase lag dos dias 0-5, exponencial dos dias 5-10, e uma fase de declínio dos dias 10-12.

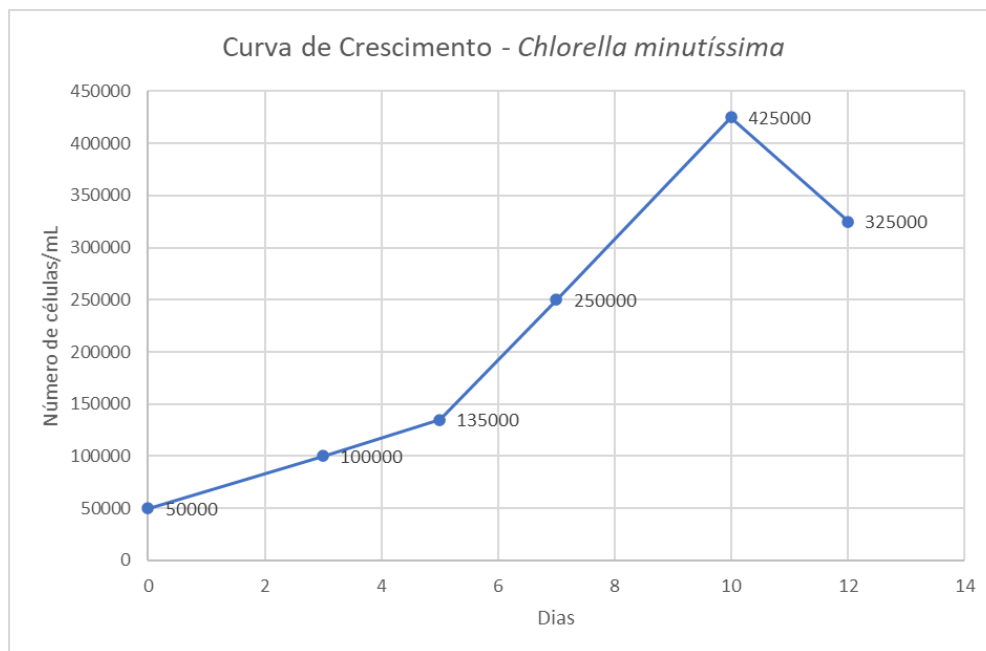


Figura 31 – Curva de crescimento: *Chlorella minutissima*- Cultivo com antimicrobiano. Curva de crescimento das células de *Chlorella minutissima* em meio BBM com adição de antimicrobianos.

Quanto às características macroscópicas das culturas contendo tetraciclina em comparação com as culturas livres de antimicrobiano (**Figura 32**), foi possível observar que para a espécie *Chlorella vulgaris* MG na cultura contendo antibiótico, ocorre uma alteração na cor da cultura, ficando mais amarelada. Já na cultura de *Chlorella vulgaris* SC contendo antibiótico, é observada uma alteração na cor, a qual fica amarronzada, e com coloração menos intensa. Além disso, os grumos/aglomerados de células somem por completo. Nas culturas de *Chlorella variabilis* NC64A não há alterações significativas no aspecto da cultura, enquanto nas culturas de contendo tetraciclina *Chlorella minutissima* a coloração da cultura se torna amarelo-amarronzada, e não são observados grumos de célula.

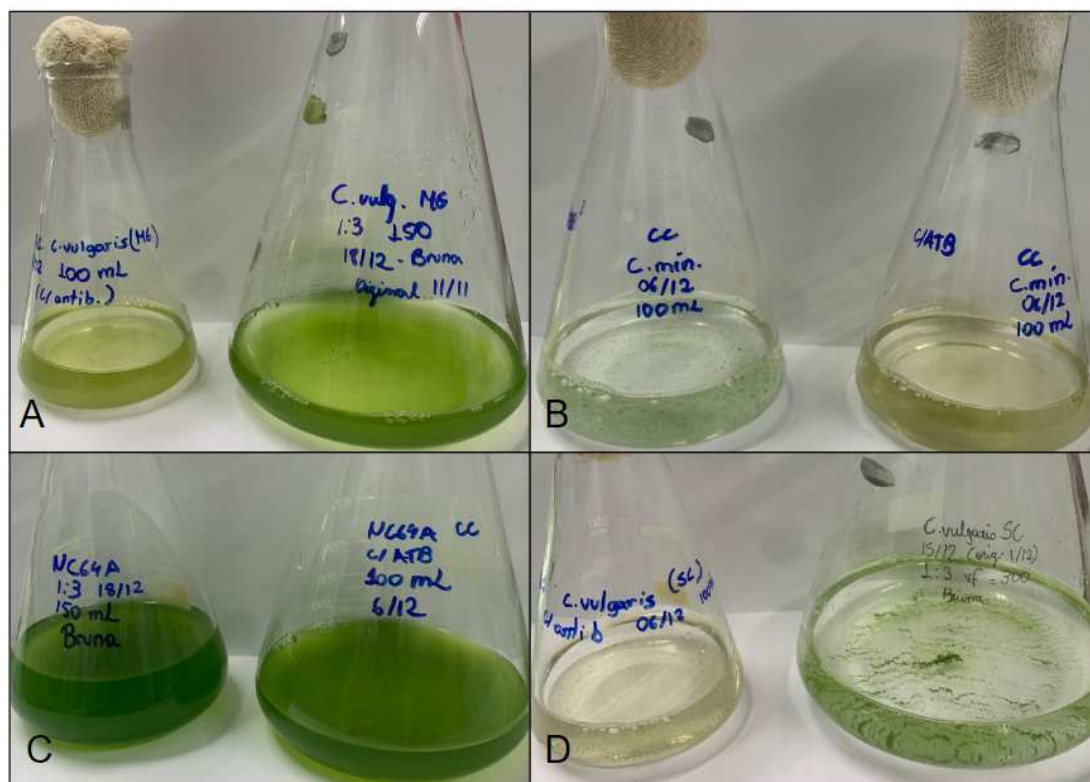


Figura 32 – Comparação entre as células cultivadas sem antimicrobiano e as células cultivadas com antimicrobianos. Em A: No erlenmeyer do lado esquerdo, cultura de *Chlorella vulgaris* MG com antimicrobiano, no erlenmeyer do lado direito, cultura de *Chlorella vulgaris* MG sem antimicrobianos. Em B: No erlenmeyer do lado esquerdo, cultura de *Chlorella minutissima* sem antimicrobiano, no erlenmeyer do lado direito, cultura de *Chlorella minutissima* com antimicrobianos. Em C: No erlenmeyer do lado esquerdo, cultura de *Chlorella variabilis* NC64A sem antimicrobiano, no erlenmeyer do lado direito, cultura de *Chlorella variabilis* NC64A com antimicrobianos. Em D: No erlenmeyer do lado esquerdo, cultura de *Chlorella vulgaris* SC com antimicrobiano, no erlenmeyer do lado direito, cultura de *Chlorella vulgaris* SC sem antimicrobianos.

Algumas espécies de microalgas, como *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella vulgaris*, e *Euglena gracilis* crescem melhor na presença de algumas bactérias, como foi mostrado por Toyama e colaboradores (2018), o que corrobora com nossos achados nas curvas de crescimento. Sendo assim, o uso de antimicrobianos apenas foi estabelecido para células cultivadas em meio altamente suscetível à contaminação (MBBM).

Em um estudo conduzido por Fisher e colaboradores (2015), foi mostrado que a formação de grupos/aglomerados de células *Chlorella vulgaris* podem ser promovidos pela presença de predadores, como *Tetrahymena thermophila*, e até mesmo seus exoprodutos. O desaparecimento dos grupos de células nas culturas de *Chlorella vulgaris* SC e *Chlorella minutissima* após o uso da tetraciclina, podem ter ocorrido por algum fenômeno semelhante, no qual um exoproducto de alguma bactéria co-cultivada com as algas poderia promover a formação destes grupos multicelulares. Para avaliação desta hipótese, novos estudos devem

ser conduzidos.

5.3. Preservação dos estoques celulares em meio sólido

Para manutenção das células a longo prazo, foram feitos slants (segundo protocolos cedidos pelo professor Dr. James Van Etten para o cultivo e manutenção das *Chlorellas variabilis*), os quais funcionam como “estoques de segurança”. Sempre que as culturas apresentarem evidência de contaminação, células anormais, ou após 6 meses de sucessivas passagens, seria possível iniciar uma nova cultura a partir desses slants. Aqui, foi observado se seria possível iniciar novas culturas a partir de slants armazenados sob refrigeração. Como evidenciado na **Figura 33**, as células cresceram nos slants, e forneceram concentrados de células, os quais após serem ressuspensos e transferidos para erlenmeyers, originaram culturas típicas de *Chlorellas variabilis* NC64A e Syngen 2-3, mostrando que esta é uma forma efetiva de se ter “estoques de segurança” das células.

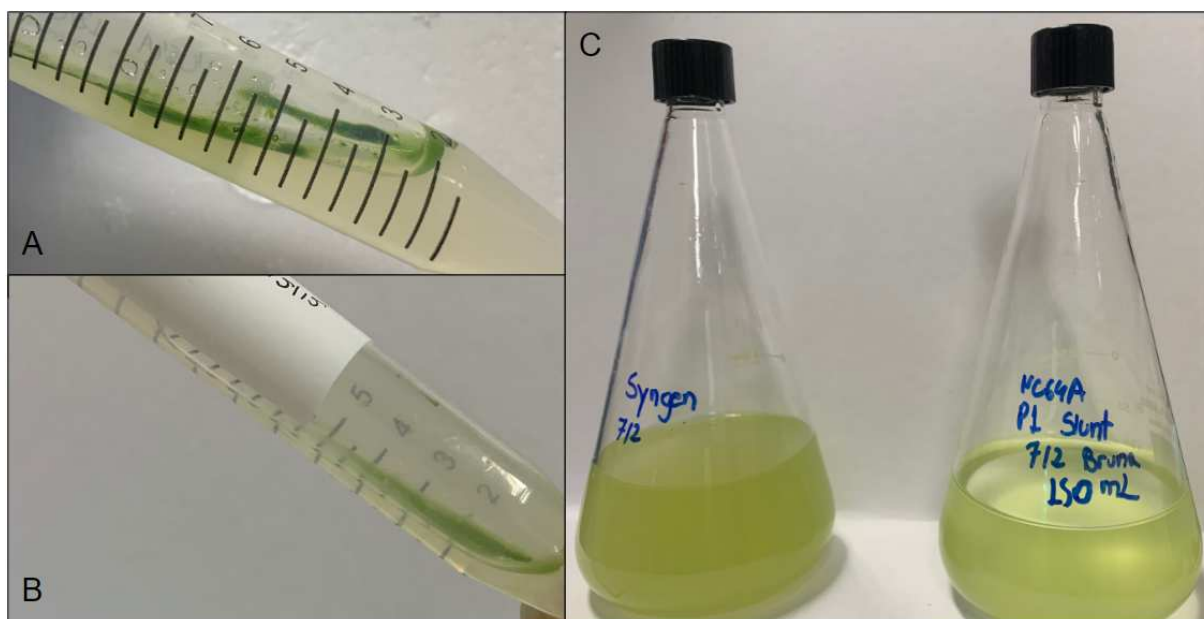


Figura 33 –*Slants* e culturas provenientes destes. Em A: slant de *Chlorella variabilis* NC64A; Em B: slant de *Chlorella variabilis* Syngen 2-3. Em C: culturas originadas dos slants.

5.4. Iniciando a prospecção viral

5.4.1. Padronização dos ensaios de placa

Para realização dos experimentos de prospecção viral, foi necessário antes realizar a padronização dos ensaios de placa em placas de Petri, placas de 6 poços e em placas de 24 poços. Esta etapa foi feita utilizando células de *Chlorella vulgaris* MG.

Para padronização dos ensaios em placa de 24 poços foram testadas diferentes configurações do método *double-layer* neste experimento (**Figura 34A**), visando observar qual fornecia um tapete de células homogêneo, de fácil visualização (com células suficientes para observar possíveis alterações) e que utilize o mínimo de células possível. Nos poços 1.3, 2.3, 3.3, 1.5, 2.5 e 3.5, uma primeira camada de BBM-ágar 1,5% solidificado foi utilizada para servir como suporte para a camada de *soft-ágar*, foi observado que esta primeira camada é fundamental para a estabilidade da segunda camada, pois em sua ausência, a camada superior fica vulnerável a quaisquer perturbações, as quais geram rachaduras (conforme visto nos demais poços). Além disso, pôde-se perceber que a mistura da amostra junto ao BBM-ágar 0,75% fundido e às células é fundamental para a homogeneidade da segunda camada, uma vez que a inoculação da amostra sobre a segunda camada, causa a diluição do ágar, gerando um efeito que interfere na visualização de possíveis placas de lise, conforme observado nos poços 1.2., 1.3., 2.2., 2.3., 3.2. e 3.3. Na linha 1, estão os poços nos quais a definição do número de células usado foi arbitrária; Na linha 2, estão os poços cujo critério para definição do número de células usado foi a área; Na linha 3, estão os poços cujo critério para definição do número de células usado foi o volume, sendo este o critério selecionado para a definição do número de células/poço a serem usadas nas prospecções, uma vez que fornece uma quantidade de células suficientes para clara visualização de possíveis efeitos citopático usando a menor quantidade de *Chlorellas* possível.

Para a padronização dos ensaios em placa de 6 poços, novamente foram testadas diferentes configurações do método *double-layer* (**Figura 34B**). É possível identificar também neste experimento que a inoculação da amostra sobre a segunda camada (camada de *soft-ágar*) pode prejudicar a visualização de placas de lise. Na coluna 1 o critério da área foi utilizado para definição do número de células usadas por poço, é possível identificar que o número de células usadas foi insuficiente para permitir a verificação com clareza de algum efeito possivelmente causado pelas amostras. Já na coluna 2, não foi utilizado nenhum critério para definição do número de células, sendo este selecionado arbitrariamente, no qual há um número de células suficientes para formar um tapete verde de células que permitiria a visualização de possíveis efeitos citopáticos. Na coluna 3, onde o critério volume foi utilizado para definição do número de células usadas por poço, assim como na coluna 2, há a formação

de um tapete verde, no entanto, seria necessário um número maior de células que na coluna anterior. Sendo assim, o número de células usadas por poço nestes experimentos foi definido arbitrariamente.

É relevante ressaltar que estes ensaios em placas de 24 e 6 poços, devem ser empregados apenas nas etapas iniciais de prospecção, nas quais observar-se-á apenas se há efeito citopático ou não, pois foi observado que as placas de lise geradas pelos chlorovírus são grandes, sendo assim, estes protocolos seriam ineficazes em ensaios de quantificação.

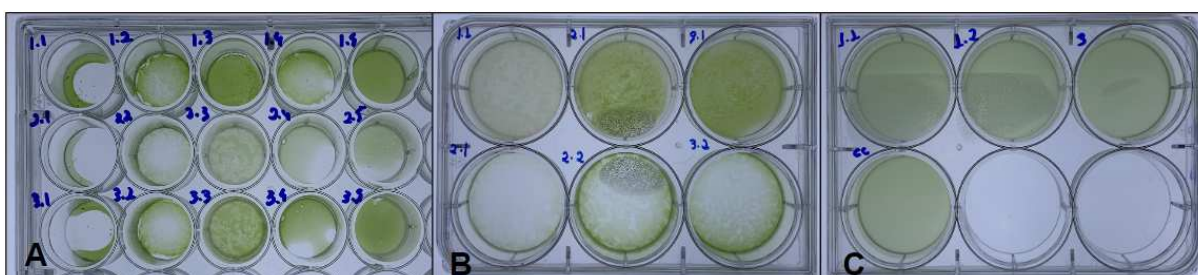


Figura 34 – Padronização dos ensaios de placa. Em A: experimento de padronização dos ensaios de placa em placa de 24 poços: é possível observar que a adição de meio BBM-ágar 1,5% como primeira camada (colunas 3 e 5), forma uma segunda camada mais homogênea. Além disso, é possível visualizar que a adição de meio BBM líquido sobre a camada de *soft*-ágar (colunas 2 e 3) gera falhas e halos que podem ser confundidos com placas de lise. Na linha 3 da placa, o número de células definido forma um tapete bastante verde e homogêneo. Em B: experimento de padronização dos ensaios de placa em placa de 6 poços: É possível observar que na linha 1, na qual há uma primeira camada de BBM-ágar 1,5%, o espalhamento das células e a formação do tapete se dá de forma mais homogênea. Pode-se ver também que na coluna 2, o número de células utilizado foi suficiente para formar uma segunda camada homogênea e verde. Em C: ensaio de prospecção feito utilizando o protocolo final definido no qual é possível ver que a mistura da amostra junto a camada de *soft*-ágar garante maior uniformidade desta.

Para realização dos ensaios de placa em placas de Petri utilizando o método *double-layer*, foi seguido inicialmente o protocolo descrito por Van Etten e colaboradores (1983) com algumas adaptações (conforme descrito no item 4.4.2.). Posteriormente, optou-se por utilizar o protocolo descrito por Quispe e colaboradores (2016), no qual um volume maior de amostra (1 mL) é utilizado na camada superior. Um volume maior de amostras representa uma melhor distribuição destas sobre a segunda camada. Para não diluir muito o *soft* BBM-ágar 0,75%, o volume deste colocado na segunda camada foi aumentado também em 1 mL (para 4 mL), desta forma a concentração final de ágar se mantém próxima de 0,7% (Figura 35).

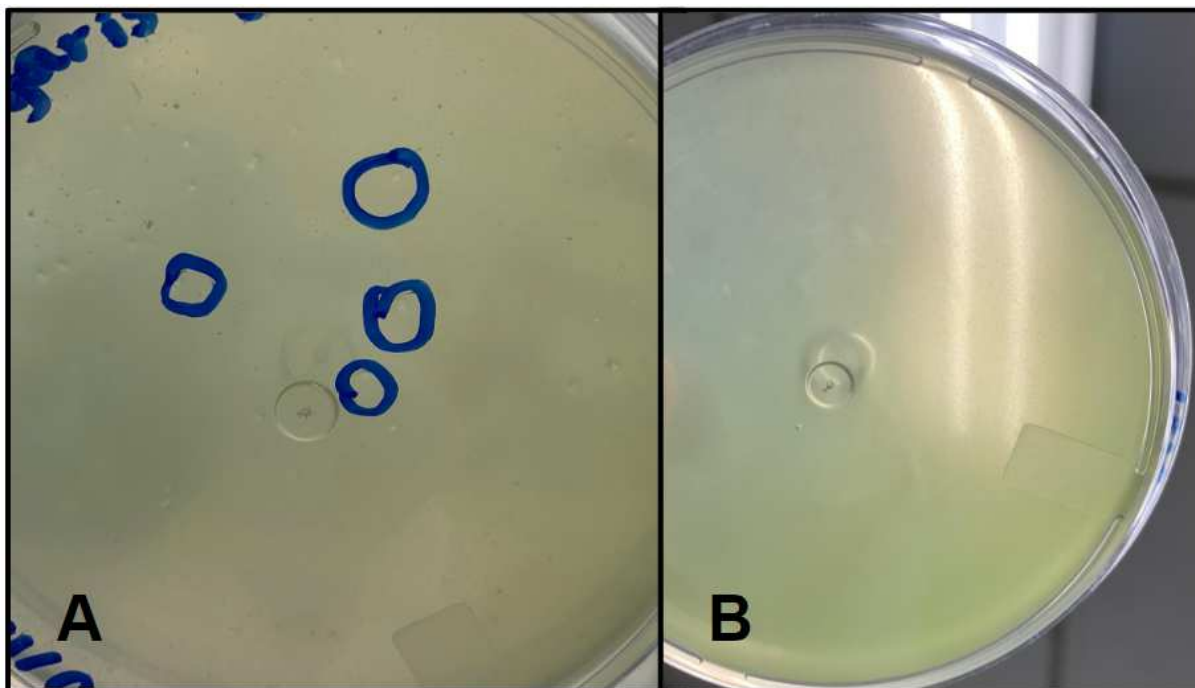


Figura 35 – Padronização dos ensaios de placa em placas de Petri . Em A: Placa feita empregando o protocolo de Van Etten e colaboradores (1983) adaptado. Em B: Placa feita empregando o protocolo de Quispe e colaboradores (2016) adaptado.

5.4.2. Avaliação da influência de microrganismos cultivados junto às microalgas nos ensaios de placa

Neste trabalho, foram usadas culturas não axênicas, e para avaliação de uma possível influência dos microrganismos cultivados junto às microalgas sobre os ensaios de placa, foram feitos ensaios de placa, em placas de Petri usando o método *double-layer*. Para este teste, não foram utilizadas amostras, mas sim meio BBM. Não houve crescimento microbiano nas placas, portanto os microrganismos cultivados junto das células hospedeiras não parecem ter efeito sobre os ensaios de placa (**Figura 36**). Isso pode ocorrer, principalmente, porque o meio BBM (e os meios BBM-ágar) são meios de cultura pobres em nutrientes, tendo apenas sais em sua composição, não contendo moléculas orgânicas como no caso do MBBM, o que favorece o crescimento, sobretudo, de células autotróficas. O meio de cultura MBBM, por sua vez, é adicionado de peptona, que serve como fonte de nitrogênio e carbono para as bactérias, e sacarose, que funciona como fonte de energia para esses procariontos. Portanto, neste meio é adicionado antimicrobiano, o que justifica o fato de este teste não ter sido feito usando as espécies que crescem em meio MBBM. Uma outra observação interessante, é que mesmo

sendo observados muitos grumos nas culturas de *Chlorella vulgaris* SC e *Chlorella minutissima*, nas placas de Petri, as células formam uma segunda camada bastante homogênea. É importante mencionar que, para realização dos ensaios de placa com células de *Microcystis*, o protocolo é o mesmo que o utilizado para as clorelas.

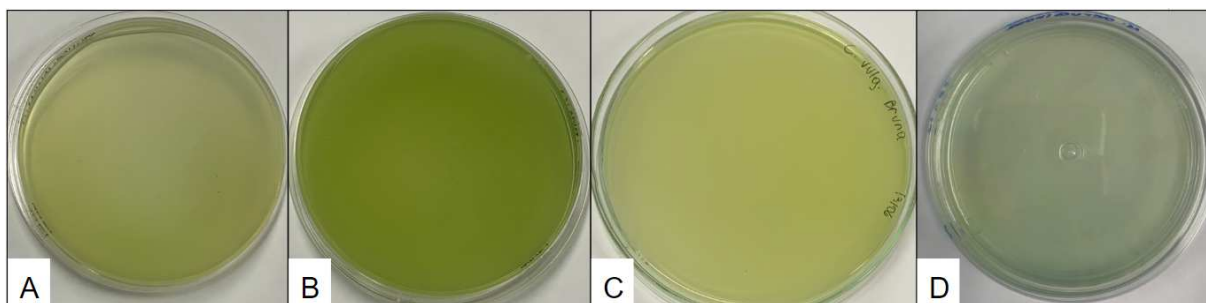


Figura 36 – Avaliação do efeito de microrganismos co-cultivados com as células hospedeiras nos ensaios de placa. Em A: placa feita utilizando células de *Chlorella minutissima*. Em B: placa feita utilizando células de *Chlorella vulgaris* SC. Em C: placa feita utilizando células de *Chlorella vulgaris* MG. Em D: placa feita utilizando células de *Microcystis aeruginosa*.

5.4.3. Triagem em placa de 96 poços

A realização de uma etapa de triagem em maior escala é de grande valia para prospecções futuras, uma vez que possibilita a análise de diversas amostras por vez. Para realização de ensaios em placa de 96 poços, é fundamental que o número de células por poço seja adequado. Para tal, analisamos neste experimento qual a quantidade de células por poço deve ser adotada de forma que forneça um tapete de células homogêneo, sem falhas, mas sem que as células fiquem em excesso, o que poderia levar à formação de múltiplas camadas de células, podendo mascarar, dessa forma, algum efeito citopático, como a formação de halos/placas de lise. Este ensaio foi feito com uma espécie de microalga, *Chlorella vulgaris*, e uma espécie de cianobactéria, *Microcystis aeruginosa*. Nos poços, as células decantam e, como a área do poço é muito pequena, uma monocamada de células é formada possibilitando a observação de placas de lise. Após observação dos poços sob microscópio óptico, percebeu-se que a condição cujo número de células foi definido arbitrariamente (**Figura 37**, imagens B e F) foi a melhor, uma vez que há a formação de um tapete de células homogêneo o qual permite a observação de efeitos citopáticos, ao mesmo tempo em que tem o mínimo de células possível para tal, o que é importante para evitar que haja células em excesso nos poços, visto que as células continuam a crescer durante o período de incubação. Este

experimento também foi usado para definir a quantidade de células a serem usadas nos ensaios de TCID50.

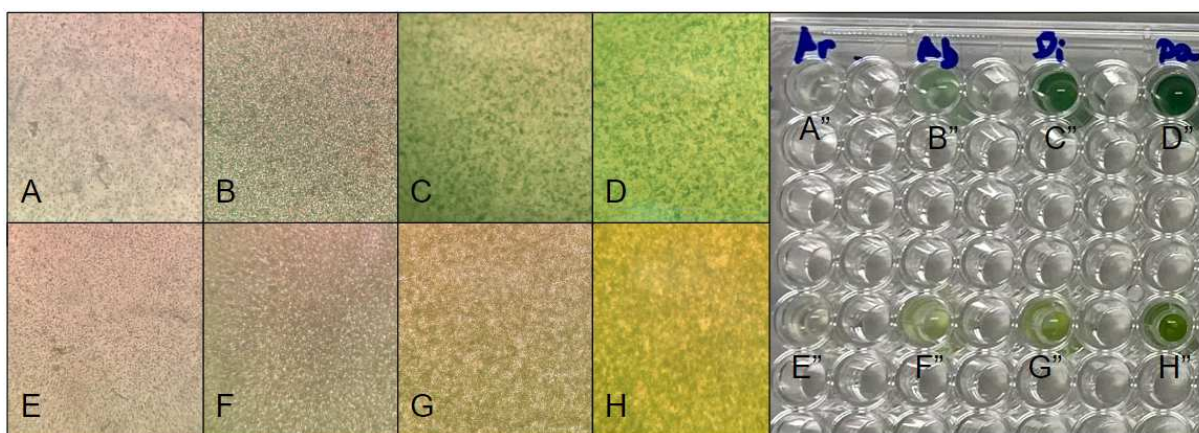


Figura 37 – Avaliação do número de células/poço. Em A, E e destacado em A'' e E'': número de células definido pelo critério de área; Em B, F e destacado em B'' e F'': número de células definido arbitrariamente; Em C, G e destacado em C'' e G'': número de células definido pelo critério de diâmetro; Em D, H e destacado em D'' e H'': número de células padrão utilizado pelo grupo.

5.5. Prospectando cianófagos

5.5.1. Prospecção em meio líquido

A realização da prospecção em meio líquido com as amostras oriundas do Rio Cipó se deu a partir do uso de amostras coletadas nos pontos 3, 5, 7 e 9. Alguns efeitos foram observados: estiolamento/amarelamento discreto das células de *Microcystis aeruginosa* no poço da amostra 9S; coletada no ponto 9 do rio, efeito de branqueamento/clareamento discreto das células nos poços das amostras 3S e 5S, coletadas nos pontos 3 e 5 do rio; estiolamento/amarelamento das células no poço da amostra 7S, coletada no ponto 7 do rio (**Figura 38A**). O conteúdo dos poços controle contendo células não infectadas e 7S (contendo células infectadas pela amostra 7S) foram coletados e colocados em microtubos (**Figura 38**). Quando colocadas lado a lado, é notável a diferença na coloração das culturas infectadas em relação ao controle. O efeito de amarelamento das células é descrito como um dos efeitos causados nas culturas pela infecção por cianófagos (QIAN *et al.*, 2022). Sendo assim, o resultado observado é um indício de que fagos podem ter sido isolados a partir da amostra 7S.

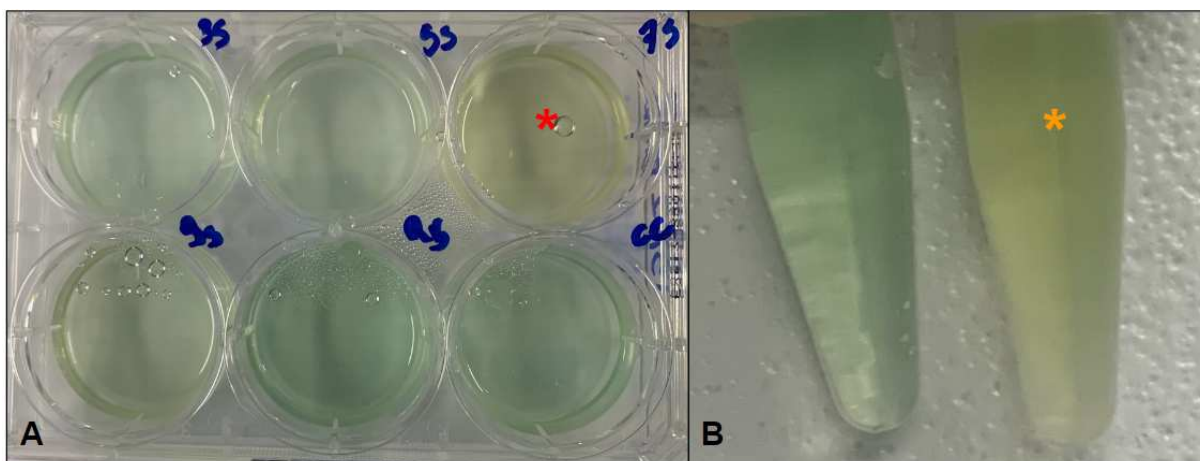


Figura 38 – Prospecção em meio líquido: resultados observados. Em A: prospecção em meio líquido, placa de 6 poços evidenciando o efeito causado por cada amostra. Asterisco vermelho: destaca o poço correspondente à amostra 7S. Em B: microtubos contendo células controle e células infectadas, destacadas pelo asterisco amarelo.

5.5.2. Ensaio de placa - *Microcystis aeruginosa*

Diferentes protocolos foram utilizados para realização dos ensaios de placa com células de cianobactéria. Na **Figura 39** estão ilustrados os 5 diferentes métodos utilizados. Não foram observadas quaisquer placas de lise quando os métodos *double-layer* foram realizados, tanto em placa de 6 poços, quanto em placa de Petri (**Figura 40**). Já a Técnica de *droplet* não parece ser útil para este modelo de células, uma vez que pequenos halos foram formados em todas as gotas, tanto das amostras testadas, quanto a do controle celular. Como as gotas inicialmente são líquidas e só após cerca de dois dias de incubação elas ressecam, estes halos podem ter sido causados pela formação de bolhas. O processo de fotossíntese e respiração celular dessas células pode ter causado bolhas de conteúdo gases as quais geraram esses halos por meio do afastamento das células que estas bolhas hipoteticamente promovem (**Figura 41**).

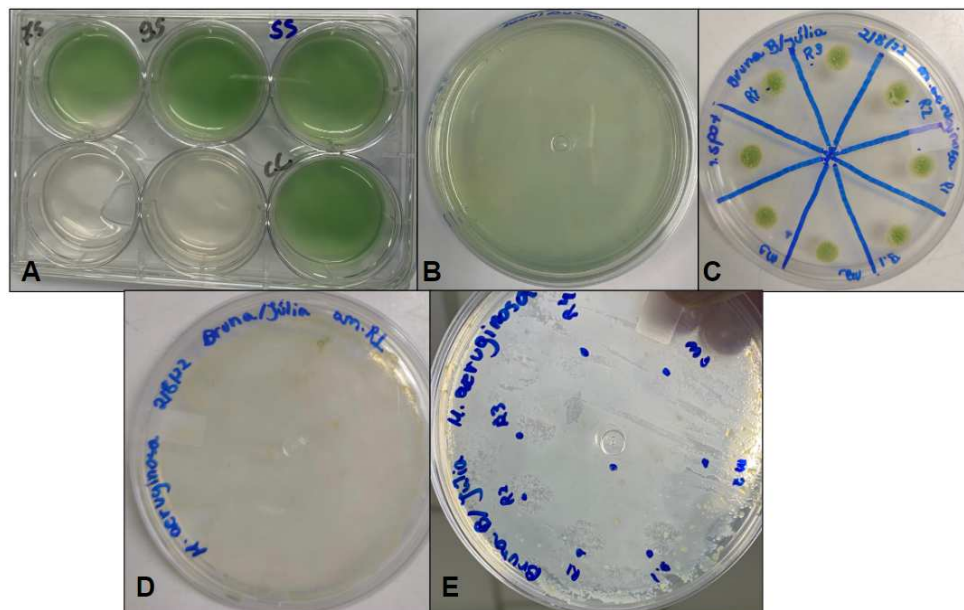


Figura 39 – Diferentes métodos utilizados para os ensaios de placa usando células de *Microcystis aeruginosa*. Em A: ensaio de placa usando o método *double-layer* em placa de 6 poços. Em B: ensaio de placa usando o método *double-layer* em placa de Petri. Em C: técnica de *droplet*. Em D: *Spot assay* modificado. Em E: *Spot assay*.

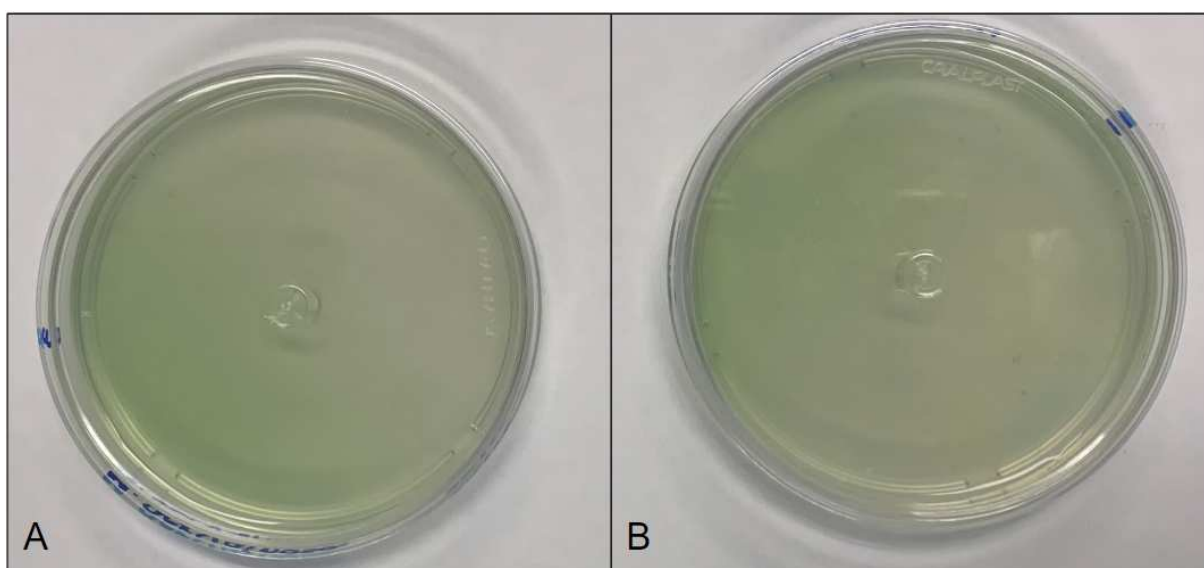


Figura 40 – Resultado dos ensaios de placas - Placas de Petri. Em A: placa de Petri inoculada com a amostra 3, na qual não são observadas placas de lise. Em B: controle celular.

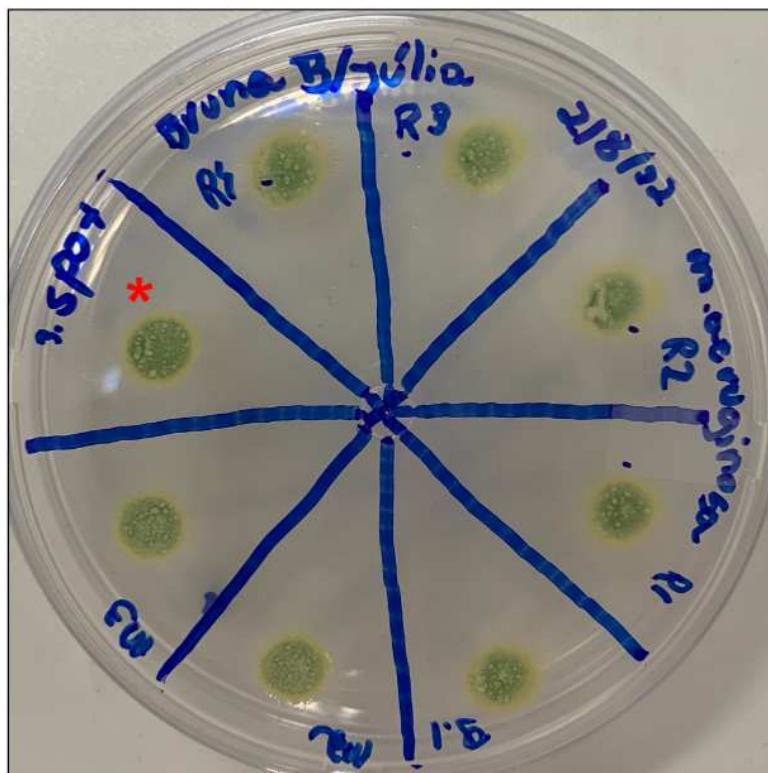


Figura 41 – Resultado dos ensaios de placas - Técnica de *droplet*. Gota correspondente ao controle celular destacada pelo asterisco vermelho, enquanto as demais, correspondentes às amostras, não estão destacadas. É possível observar em todas as gotas pequenos halos dispersos.

Quando realizado ensaio de placa utilizando o método *spot*, foram formados halos nos locais em que as amostras foram inoculadas, o que evidencia que algo nessas amostras está causando morte das células no local de inoculação desta (**Figura 42**).

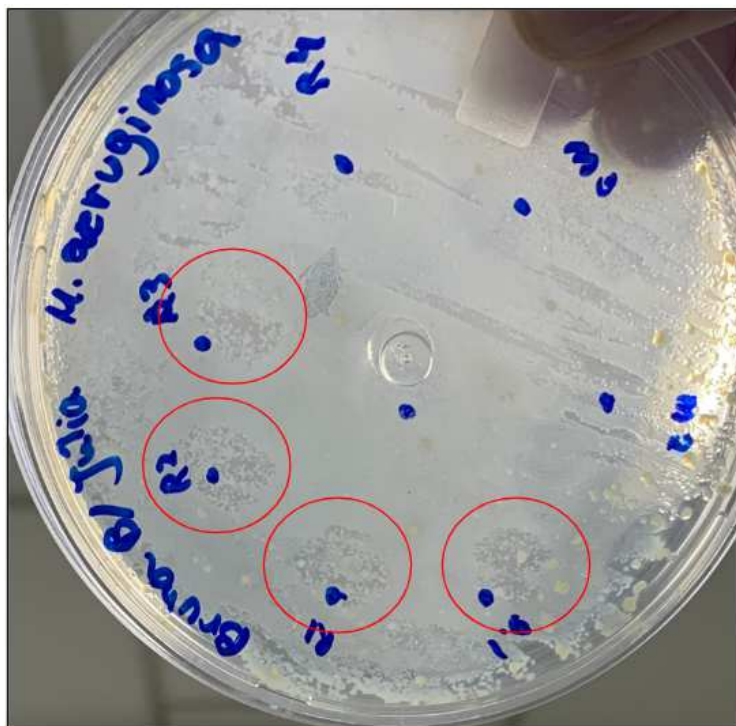


Figura 42 – Resultado do ensaio de placa realizado empregando método *spot*. Destacados pelos círculos vermelhos: halos observados.

Nos ensaios conduzidos empregando o método de *spot assay* modificado, não foram observados halos, placas de lise ou quaisquer alterações que evidenciem a presença de fagos (Figura 43).



Figura 43 – Resultado dos ensaios realizados empregando método *spot* modificado. À esquerda, placa do controle celular. À direita, placa inoculada com amostra para realização de ensaio piloto.

5.6. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para cianófagos

5.6.1. *Tissue Culture Infectious Dose (TCID50)*

Não foi possível observar o surgimento de placas de lise nos ensaios de placas (pelo método *double-layer*) feitos utilizando o isolado 7S. Diante disso, foi feito então um ensaio de *Tissue Culture Infectious Dose (TCID50)* para observar possíveis efeitos citopáticos, avaliar se o efeito citopático varia conforme a diluição da amostra, e estimar o título viral do isolado 7S.

Não foram observadas alterações macroscópicas em relação aos controles, estiolamento ou branqueamento. Houve ressecamento dos poços próximos às bordas, portanto os poços das linhas e colunas destacadas pelos retângulos vermelhos na **Figura 44**, foram desconsiderados neste experimento. Ao analisar a placa sob microscópio óptico (aumento de 100x), é possível visualizar diferenças entre as células dos poços não infectados e as células de alguns poços infectados. Nos poços em que as células não foram infectadas, a distribuição destas é mais homogênea, enquanto nos poços contendo o isolado 7S diluído, a distribuição das células não é homogênea, sendo observados grandes espaços vazios (**Figura 45**). Esta diferença discreta entre células não-infectadas e infectadas não foi considerada suficiente para ser caracterizada como possível efeito citopático, sobretudo, porque este efeito não foi observado nos poços contendo diluições menores (colunas das diluições de 10^{-1} e 10^{-3}). Este resultado pode conduzir à duas conclusões: 1) O título viral do estoque do possível isolado 7S é ínfimo, tendo a diluição impedido a clara visualização de efeito citopático; 2) o possível isolado 7S não contém fagos conforme hipotetizado, e os efeitos previamente observado são devidos a fatores não identificados.

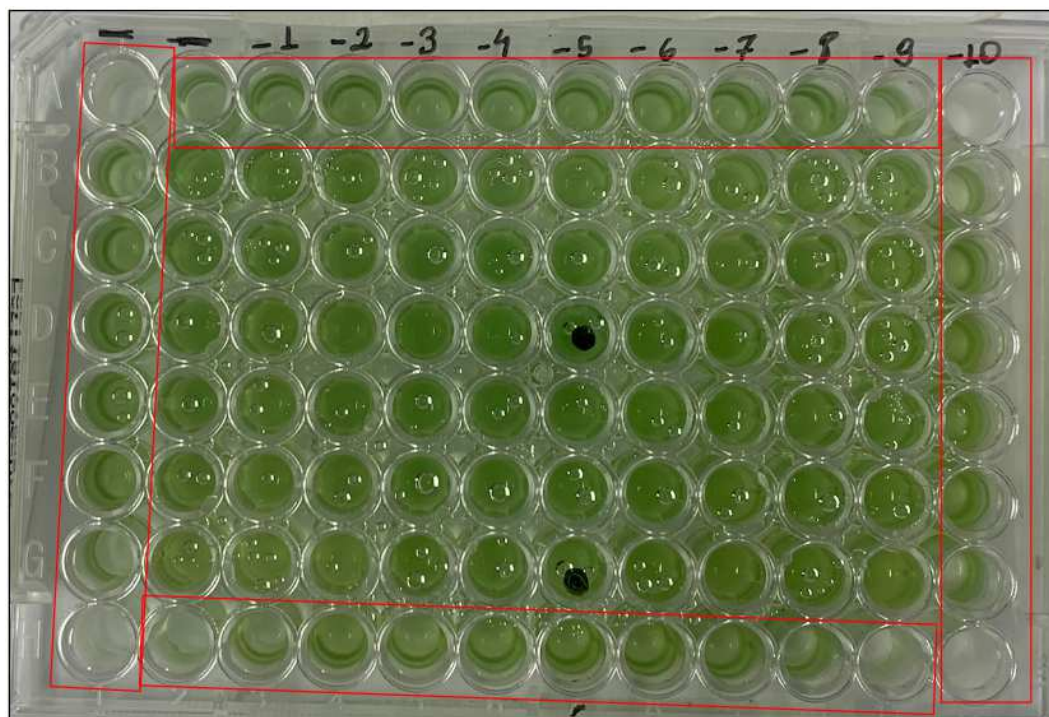


Figura 44 – Resultado do ensaio de TCID50. Retângulos indicam linhas e colunas nas quais houve ressecamento dos poços após o período de incubação.

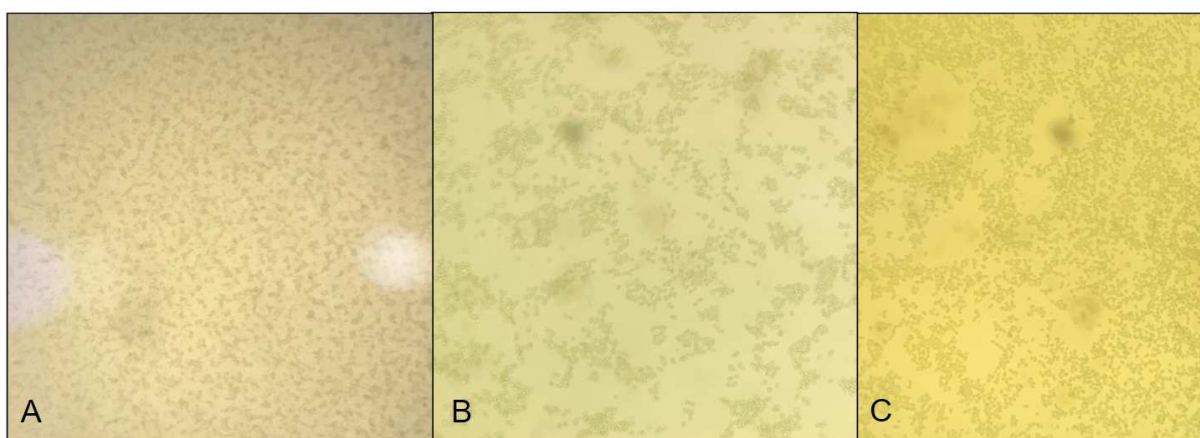


Figura 45 – Micrografias evidenciando a diferença entre as células infectadas e não infectadas. Em A: Células não infectadas. Em B e C: células inoculadas com amostras diluídas (diluição de 10^{-5}).

Para validação deste método, o vírus PBCV-1 foi titulado, usando como células hospedeiras *Chlorella variabilis* NC64A. Neste caso, foi possível visualizar efeito de branqueamento, o que indica lise completa das células nos poços, evidenciada pela perda da coloração verde típica, de maneira dose-dependente (Figura 46). O título calculado foi de 2.7×10^8 TCID50/mL. Os poços contendo controles celulares G2, H2 e H1, foram desconsiderados, pois houve contaminação destes.



Figura 46 – Validação do ensaio de TCID50 utilizando soluções estoque de PBCV-1. Na placa de 96 poços é possível observar efeito de branqueamento (lise das células) em todos os poços infectados com o isolado diluído (diluições 10^{-1} a 10^{-6} , colunas 3-8) e em 9 poços da diluição 10^{-7} (coluna 9).

5.6.2. Caracterização de efeito citopático em *Microcystis aeruginosa*: Microscopia óptica

As células estioladas e as células controle coletadas após a prospecção em meio líquido foram centrifugadas e os pellets usados para análise microscópica. Após análise destes sob microscópio óptico (aumento de 1000x), foram observadas células de *Microcystis aeruginosa* típicas no controle (**Figura 47A**), enquanto a observação da lâmina feita a partir do pellet de células infectadas pelo isolado 7S revelou grandes aglomerados de restos celulares e células sofrendo lise (**Figura 47B-F**). No aumento de 1000 vezes, é possível identificar, ainda, grandes aglomerados de restos celulares (**Figura 48**).

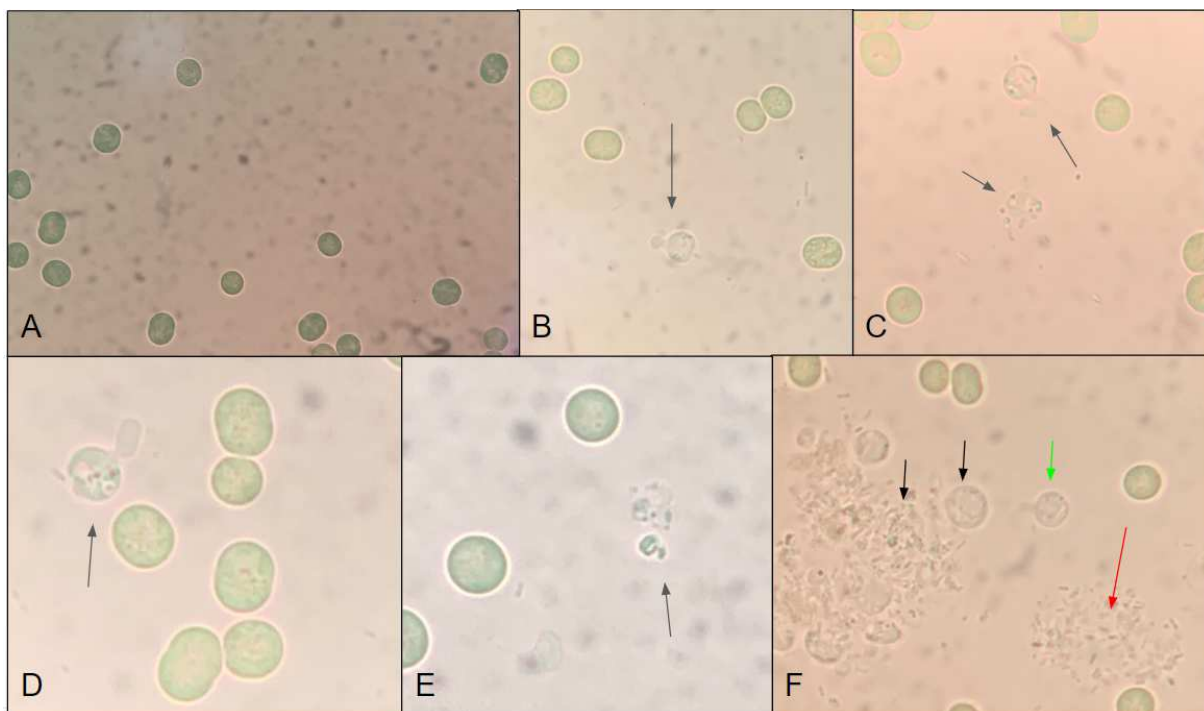


Figura 47 – Micrografias evidenciando possível efeito citopático causado pelo isolado 7S. Em A: células não infectadas. Em B, C e D: células infectadas pelo isolado 7S sofrendo lise, destacadas pelas setas. Em E: restos celulares observados, destacados pela seta. Em F: destacado pela seta verde, célula infectada sofrendo lise. Destacado pela seta vermelha e setas pretas: células vazias e grandes aglomerados de restos celulares.

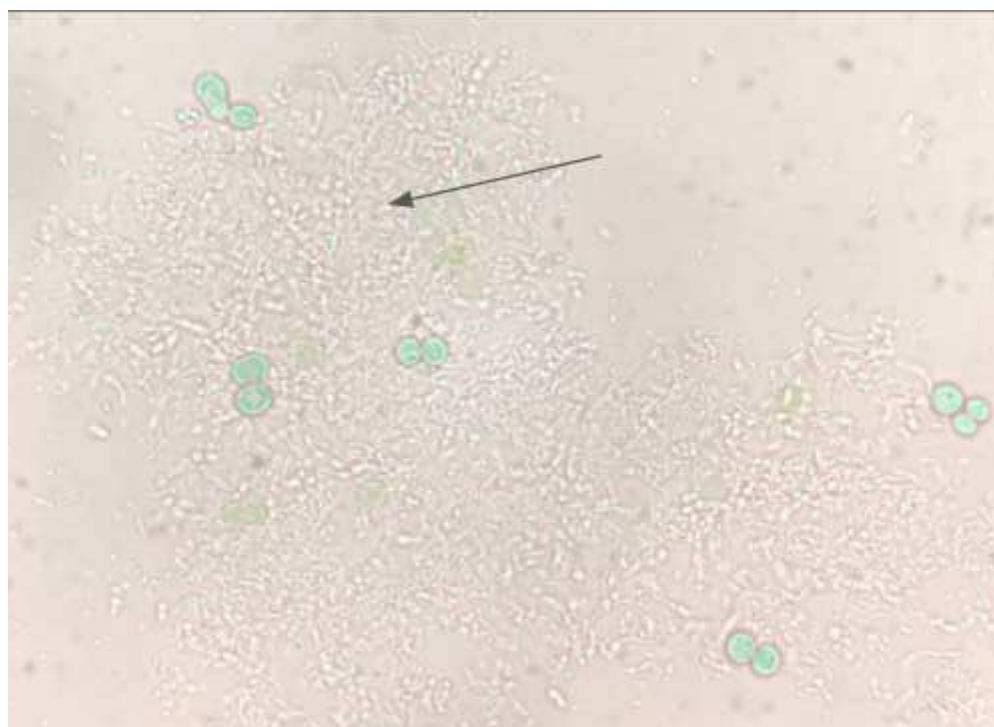


Figura 48 – Presença de grandes aglomerados de restos celulares. A seta destaca o aglomerado de restos celulares de *Microcystis aeruginosa* infectada pelo isolado 7S.

Para compreender como é o aspecto das células lisadas e restos celulares de cianobactérias, um trabalho de Jung e colaboradores (2022) que descreve o processo lise celular (das células de *Microcystis aeruginosa*), foi utilizado como referência. Após o tratamento com manitol, substância utilizada para promover a lise celular, as paredes celulares se romperam rapidamente e o conteúdo intracelular (incluindo a clorofila), foi liberado no meio, mantendo a cor verde. Por fim, a cor verde é desbotada, indicando a morte das células de *M. aeruginosa* (JUNG *et al.*, 2022).

5.6.3. Análises comparativas genômicas e filogenéticas de fagos que infectam *Microcystis*

Para melhor compreender o grupo dos cianófagos de interesse neste estudo, suas características e história evolutiva, análises comparativas genômicas e filogenéticas dos fagos que infectam *Microcystis* foram realizadas.

Até dezembro de 2023, havia um total de 12 genomas de cianofagos associados a *Microcystis* sp. depositados no GenBank. Após a compilação e análise dos dados genéticos de cianófagos que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*, fica evidente que este grupo de vírus é altamente diverso. Não há homogeneidade entre os fagos deste grupo em nenhum aspecto: o tamanho do genoma varia de 39.679 bp (Mwe-Yong1112-1) até 273.876 bp (MaAM05); o conteúdo %GC varia de 35,17% (Mic-1) até 71,80% (Mae-Yong1326-1); o número de CDS varia de 51(MaeS-yong1) até 263 (MaAM05), e curiosamente, o menor genoma não é necessariamente o que possui menos CDS. Além disso, a topologia do DNA também é variável, sendo linear para alguns fagos e circular para outros. Assim como os chlorovírus (VAN ETTEN *et al.*, 2020), alguns fagos possuem genes que codificam tRNAs, conforme evidenciado no **Tabela 5**.

Tabela 5 – Diferentes características dos cianófagos que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*

Cianófago	Tamanho do genoma	tRNAs Aragorn	tRNAs RNAscan-SE	Número de CDS	%GC	Topologia do DNA	Genbank ID	Local de onde foi isolado	Referência
Mwe-Yong1112-1	39679 bp	0	0	53	66,60%	Linear	MZ436628.1	China	CAI <i>et al.</i> , 2022
Mea-Yong924-1	40325 bp	0	0	59	48,32%	Circular	MZ447863.1	Lago Yangming, China	QIAN <i>et al.</i> , 2022
MACPNOA1	42473 bp	0	0	53	68,26%	Linear	KY697807.1	China	GU e LI, 2019
MaeS-yong1	43665 bp	0	0	51	66,70%	Linear	MT855965.1	China	YANG <i>et al.</i> , 2020b
MweS-yong2	44530 bp	0	1 (Ser)	61	71,62%	Linear	OM681334.1	China	WANG <i>et al.</i> , 2022b
Mae-Yong1326-1	48822 bp	1 (ala)	0	53	71,80%	Linear	OP028995.1	Lago Taihu, China	WANG <i>et al.</i> , 2022
Me-ZS1	49665 bp	0	0	68	58,28%	Linear	MK069556.2	Lago próximo a Cao-guang-biao, China	LIN <i>et al.</i> , 2020
Mins1	49966 bp	1 (Pro Thr)	1 (arg)	71	71,67%	Circular	MZ923504.1	Córrego Mayang, China	ZHANG <i>et al.</i> , 2022
Mic-1	92627 bp	0	0	111	35,17%	Circular	MN013189.1	Lago Chaohu, China	YANG <i>et al.</i> , 2020
Ma-LMM01	162109 bp	2 (met, tyr)	1 (tyr)	181	45,95%	Circular	AB231700.1	Lago Mikata, Japão	YOSHIDA <i>et al.</i> , 2006
MaMV-DC	169223 bp	2 (met, tyr)	3 (tyr, met, met)	186	46,03%	Circular	KF356199.1	Lago Dainchi, China	OU <i>et al.</i> , 2013
MaAM05	273876 bp	3 (tsp, asn, arg)	3 (tsp, asn, arg)	263	54,22%	Linear	MW495066.1	Bacia de Tratamento de lodo do Hospital Songklanagarind, Tailândia	NAKNAEN <i>et al.</i> , 2021
Ma-LBP	-	-	-	-	-	-	-	Lago Baroon, Austrália	TUCKER e POLLARD, 2005

Os resultados das análises feitas utilizando a ferramenta Mauve evidenciam que de fato estes fagos são muito diferentes entre si. Não há nenhum bloco sintênico de DNA genômico conservado entre todos os cianófagos. São observados blocos conservados apenas entre os fagos Ma-LMM01 e MaMV-DC, nos quais quase todo o genoma é conservado (Figura 49).

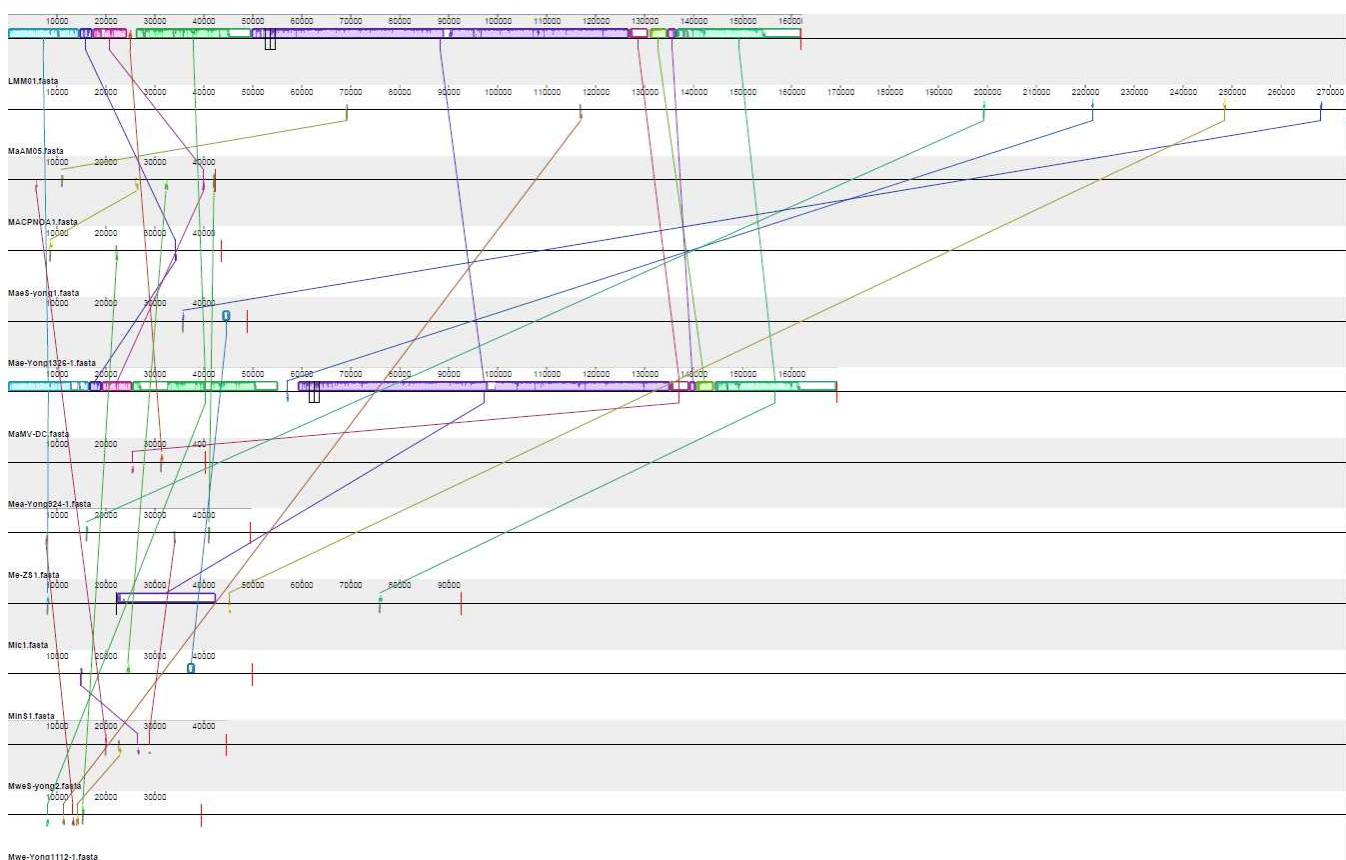


Figura 49 – Análise de sintenia dos cianófagos. Cada bloco colorido (de cores iguais) engloba uma região da sequência do genoma que se alinhou à parte de outro genoma (de outro cianófago), e é, portanto, homóloga. As

linhas destacam as regiões em cada genoma que são homólogas.

Utilizando a ferramenta ProteinOrtho, tentamos definir os COGs, clusters de genes ortólogos, que são genes encontrados em diferentes espécies originados a partir de um único gene do ancestral comum por processo de especiação. Não foram encontrados quaisquer COGs pan-cianófagos que infectam *Microcystis* sp., o que evidencia o quão variado é este grupo de vírus. O fago Mea-Yong924-1 não possui nenhum COG compartilhado com os outros cianófagos (**Figura 50**). Os fagos Ma-LMM01 e MaMV-DC são os únicos que compartilham um número significativo de COGs, 148. Além disso, eles compartilham 5 COGs com o fago Mic-1 e 1 COG com o fago MaAM05. Os demais fagos compartilham apenas alguns COGs pontuais, o que corrobora com a hipótese de que estes vírus são muito distintos, e muito provavelmente, não possuem as mesmas origens.

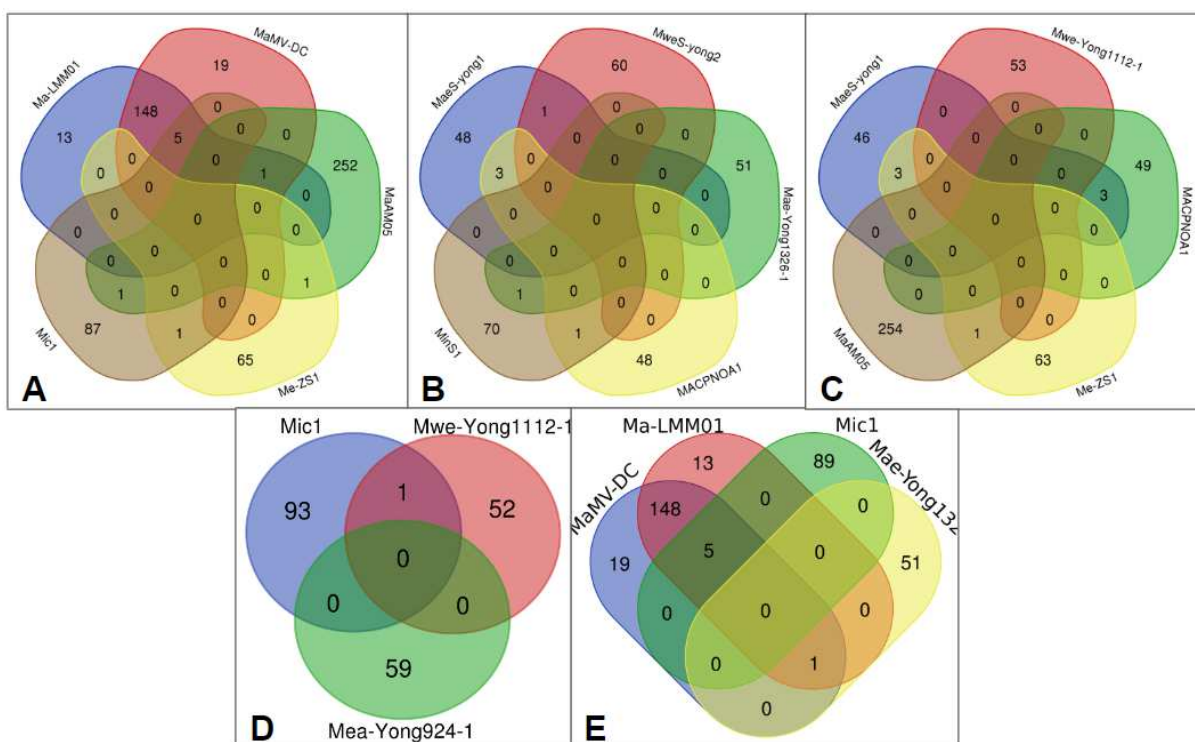


Figura 50 –Diagramas de Venn evidenciando os COGs compartilhados entre os cianófagos. Em A: Diagrama de Venn mostrando COGs compartilhados entre Ma-LMM01, MaMV-DC, Mic1, Me-ZS1 e MaAM05; Em B: Diagrama de Venn exibindo os COGs compartilhados entre MinS1, MACPNOA1, Mae-YONG1326-1, MaeS-yong1 e MweS-yong2; Em C: Diagrama de Venn mostrando COGs compartilhados entre MACPNOA1, MaeS-yong1, Mwe-Yong1112-1, Me-ZS1 e MaAM05; Em D: Diagrama de Venn mostrando COGs compartilhados entre Mic1 e Mwe-Yong1112-1, o fago Mea-Yong924-1 não compartilha nenhum COG com os demais; Em E: Diagrama de Venn mostrando COGs compartilhadas entre Ma-LMM01, MaMV-DC, Mic1 e Mae-Yong1326-1.

Ao analisarmos a árvore filogenética obtida utilizando o genoma completo dos cianófagos, fica evidente que estes não são de forma alguma um grupo monofilético, tendo muito provavelmente origens e histórias evolutivas distintas (**Figura 51**). Com exceção dos fagos Ma-LMM01 e MaMV-DC, os demais apresentam-se muito distantes uns dos outros, estando frequentemente mais próximos de fagos de outros hospedeiros. Estes fagos de outros hospedeiros foram incluídos na árvore com o intuito de avaliar se os cianófagos se agrupam em um único clado. É possível observar, entretanto, que os cianófagos não formam um clado único, e, conforme mencionado, por vezes encontram-se próximos aos bacteriófagos que infectam outros hospedeiros. Todos estes dados corroboram para a hipótese de que estes vírus são muito diferentes uns dos outros em todos os aspectos possíveis (genéticos e filogenéticos), sendo assim, novos isolados seriam fundamentais para preencher as lacunas na história evolutiva deste grupo e aumentar o entendimento deste como um todo.

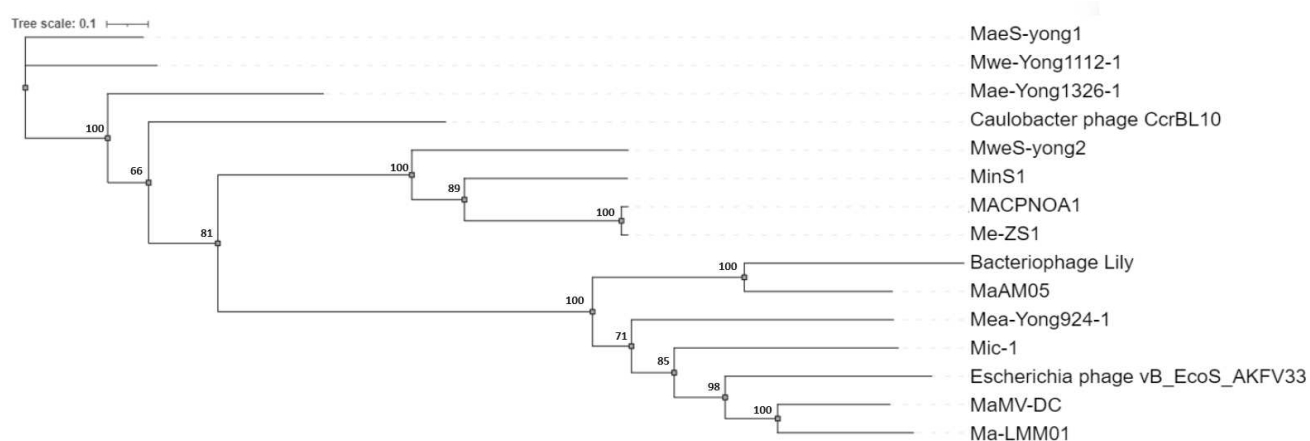


Figura 51 – Árvore filogenética dos cianófagos. Árvore filogenética dos cianófagos que infectam *Microcystis* construída tendo como base o genoma completo. Além destes, outros bacteriófagos da ordem *Caudovirales* de diferentes famílias também podem ser observados: Bacteriophage Lily, Escherichia phage vB_EcoS_AKFV33 e Caulobacter phage CcrBL10. Os cianófagos não se agrupam em um único clado.

5.7. Trabalhando com amostras possivelmente positivas para vírus que infectam clorelas.

5.7.1. Ensaio de placa - *Chlorella vulgaris*

O protocolo previamente definido foi empregado para realizar ensaios de placa em placas de Petri utilizando amostras da Estação de Tratamento de Esgoto - ETE Onça, e após

15 dias de incubação, foram observadas placas de lise. As células hospedeiras usadas foram da espécie *Chlorella vulgaris* MG. Foram coletadas 12 placas de lise desta placa de Petri. Após a coleta, os 12 isolados (correspondentes as 12 placas de lise) foram submetidos à etapa de expansão às cegas (**Figura 52A**), na qual foram observadas diferenças entre os tubos contendo células infectadas em relação ao controle celular. O sobrenadante no controle celular é límpido, enquanto o sobrenadante dos tubos contendo isolados e células é turvo e esverdeado, o que pode ocorrer devido a presença de restos celulares dispersos no líquido. Foram coletadas células do controle celular e células infectadas, as quais foram observadas sob microscópio óptico (aumento 1000x). Células íntegras foram vistas no controle, enquanto as células infectadas apresentavam-se lisadas, com extravasamento do conteúdo celular para o meio (**Figura 52B-E**).

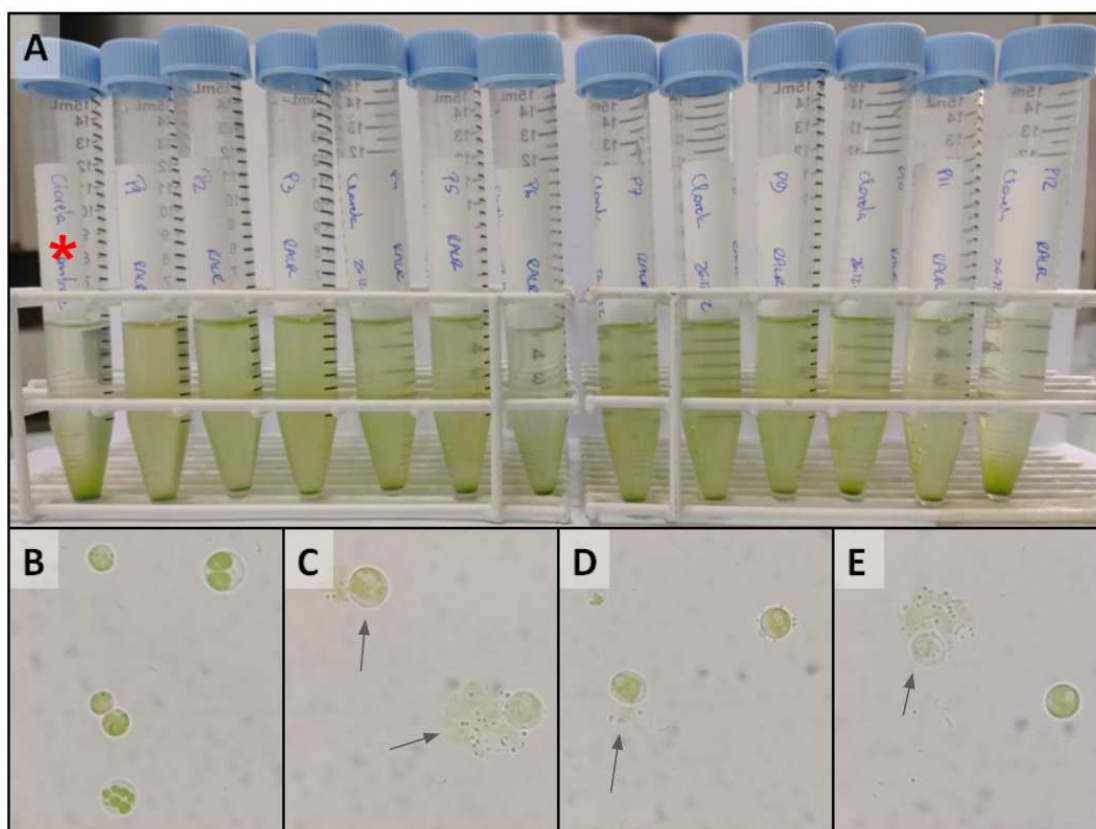


Figura 52 – Etapa de expansão às cegas. Em A: tubos falcon contendo células controle (primeiro tubo, marcado por um asterisco vermelho) e demais tubos contendo células infectadas. Em B: células controle. Em C-E: células infectadas, as setas apontam para as células lisadas.

Todos os tubos foram centrifugados e os sobrenadantes dos 12 diferentes isolados originados das 12 placas de lise coletadas foram plaqueados. Novamente foram observadas placas de lise nas 12 placas de Petri feitas e nenhuma placa de lise nos controles celulares.

Diferentes isolados apresentaram diferentes fenótipos de placa, conforme mostrado na **Figura 53**, imagens A, B e C.

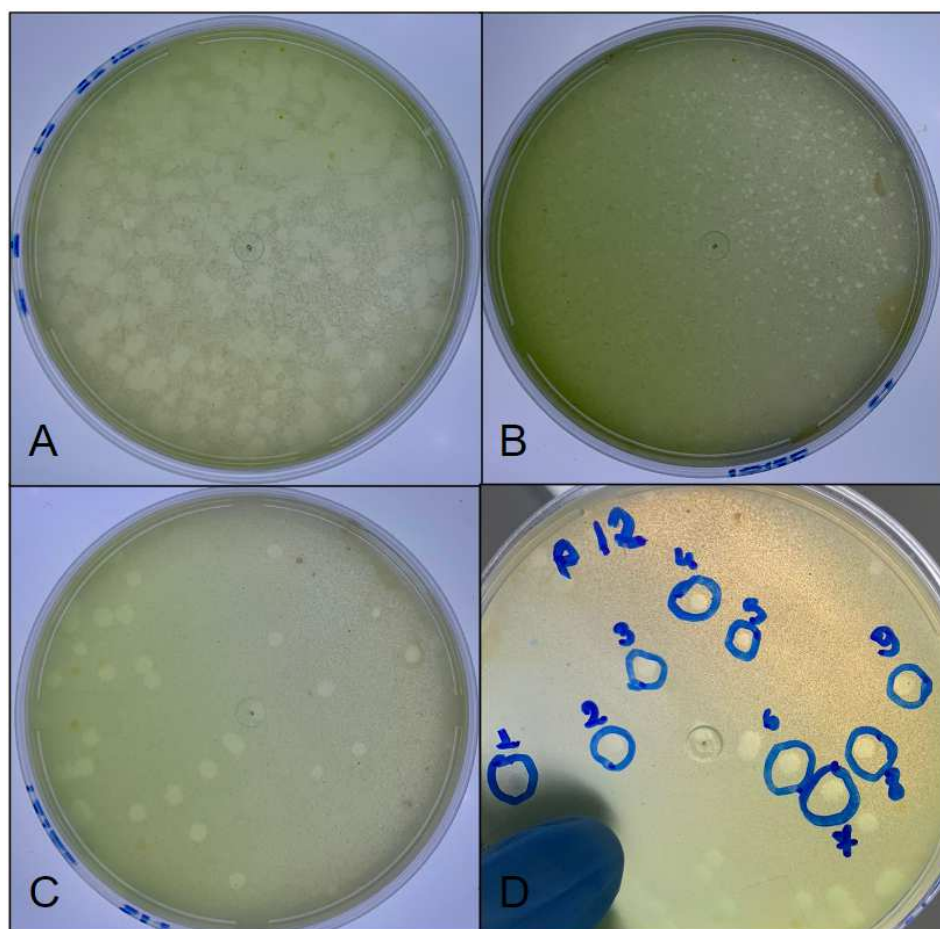


Figura 53 – Placas de lise causadas pelos isolados. Em A, B e C: diferentes fenótipos de placa provenientes de diferentes isolados. Em D: placa inoculada com o isolado 12, e em destaque as 9 placas de lise coletadas.

Na placa de Petri inoculada pelo isolado 12, foram coletadas 9 placas de lise (mostradas na **Figura 53D**). A placa de número 7 foi selecionada e purificada (conforme descrito no tópico 4.7.2). Este foi então intitulado isolado 127 e utilizado para experimentos posteriores.

5.7.2. Produção de estoques virais

Após a etapa de purificação das placas de lise formadas pelo isolado 127 utilizando o protocolo de expansão às cegas, o estoque obtido a partir deste isolado foi titulado. Foram observadas 9 placas de lise na placa de Petri cuja diluição era de 10^{-3} , sendo assim o título inicial calculado foi de 1×10^4 UFP/mL. Visando obter títulos maiores, foi feita uma nova

etapa de expansão, na qual foi utilizada uma M.O.I. de 0,001. Nesta etapa os tubos ficaram 4 horas na incubadora shaker, e depois por 4 dias na incubadora refrigerada. O estoque obtido foi novamente titulado, no entanto, na placa de Petri correspondente à diluição de 10^{-2} , apenas três placas foram encontradas, sendo assim o título calculado foi de $3,3 \times 10^2$ UFP/mL, ou seja, houve uma redução do título viral. As células de *Chlorella* geralmente sofrem decantação quando colocadas em um tubo falcon, o que pode minimizar a probabilidade dos vírus interagirem com as células hospedeiras, uma vez que eles ficam em suspensão enquanto as células ficam decantadas no fundo do tubo. Tal fato, junto da M.O.I. ínfima utilizada, podem ser razões pelas quais o título diminuiu.

Visando promover a adsorção das partículas virais em suspensão às células hospedeiras, o tempo sob agitação na incubadora shaker foi aumentado para dois dias, enquanto o tempo de incubação em incubadora refrigerada foi diminuído para três dias. Uma M.O.I. de 0,01 também foi adotada, a qual foi selecionada usando como referência o trabalho de Abrahão e colaboradores (2014), que mostrou ser a M.O.I. de 0,01 a mais eficiente para produção de partículas virais infecciosas. O estoque foi novamente titulado, e dessa vez, foram contabilizadas 215 placas de lise na placa de Petri correspondente à diluição de 10^{-2} e 21 placas de lise na placa de Petri correspondente à diluição de 10^{-3} , sendo o título calculado para este estoque igual a $2,4 \times 10^4$ UFP/mL. Houve um aumento de 73 vezes no título viral utilizando este segundo protocolo, o qual foi selecionado para ser empregado para produzir vírus quando se sabe o título inicial, visto que nesses casos há como definir uma M.O.I. para o experimento. Quando o título não é conhecido, sugere-se que o protocolo de expansão às cegas seja utilizado. Ao realizar as etapas de expansão, grumos/grânulos de células são formados (**Figura 54**). Estes foram posteriormente observados, também, sob microscópio óptico.

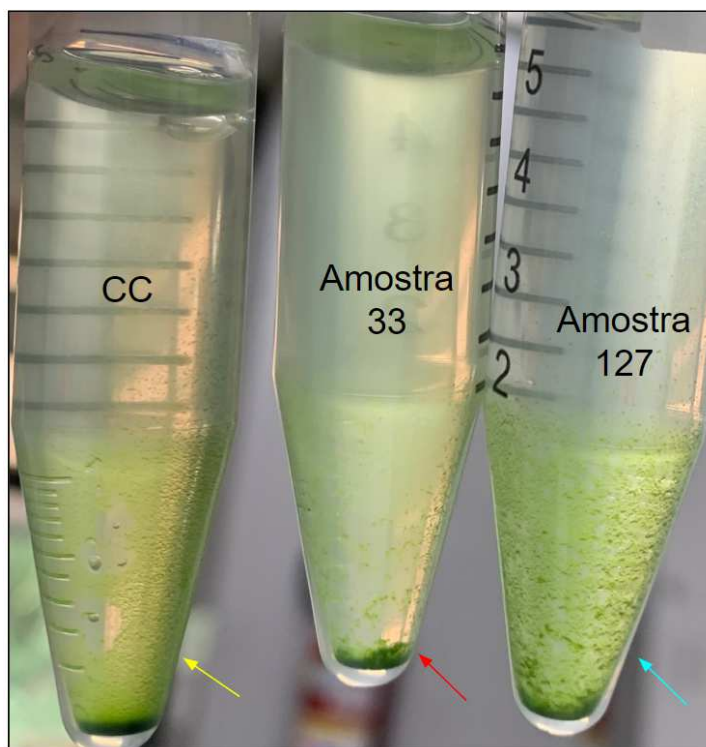


Figura 54 – Aspecto macroscópico das células infectadas comparadas às células não infectadas. Seta amarela: aspecto uniforme das células controle. Seta vermelha: indica o pellet com aspecto granuloso das células infectadas pelo isolado 33 (originado da placa de lise 3, da placa de Petri 3). Seta azul: aponta para grumos observados no tubo contendo células infectadas pelo isolado 127. .

5.7.3. Purificação viral

Uma tentativa de purificar o isolado 127 foi realizada. Para tal, foi empregado um protocolo similar ao usado para purificar Marseillevírus, os quais têm um tamanho similar ao dos chlorovírus, de aproximadamente 250 nm (AHERFI *et al.*, 2014). Após proceder com o protocolo descrito no tópico 4.7.4, notou-se que não foi formado pellet observável, ainda assim, o líquido do tubo centrifugado foi descartado, de forma que restasse apenas alguns microlitros no tubo, este resíduo foi coletado e diluído em *virus stabilization buffer*, ou tampão de estabilização viral. O produto da tentativa de purificação foi plaqueado, mas não foram observadas placas de lise. O protocolo empregado foi, portanto, inadequado. Enquanto características morfológicas das partículas virais do isolado 127 não for elucidado, não será possível utilizar um protocolo adequado para a purificação viral, uma vez que o método de purificação de vírus por ultracentrifugação se baseia no tamanho e densidade da partícula viral.

5.7.4. Ensaio piloto de Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Um ensaio piloto de qPCR foi conduzido com o intuito de verificar se haveria amplificação do material genético do isolado 127 utilizando primers que tinham como o alvo os genes: da DNA polimerase do PBCV-1 (GRABHERR *et al.*, 1992) e da proteína principal do capsídeo do Chlorella vírus XW01 (SHENG *et al.*, 2022). Conforme mostrado na **Figura 55**, houve amplificação do gene da proteína principal do capsídeo do Chlorella vírus XW01 na amostra 127. O CT, *cycle threshold*, foi de 37, ou seja, houve uma amplificação tardia do gene, que evidencia que o DNA do qual o gene foi amplificado não estava em grandes quantidades na amostra testada. Posteriormente, foram feitos outros ensaios de PCR por alunos do grupo que identificaram que houve amplificação do gene alvo nos genomas dos controles celulares, mostrando que o par de primers desenvolvido e utilizado por Sheng e colaboradores (2022) identifica um gene que também está presente no DNA do hospedeiro.

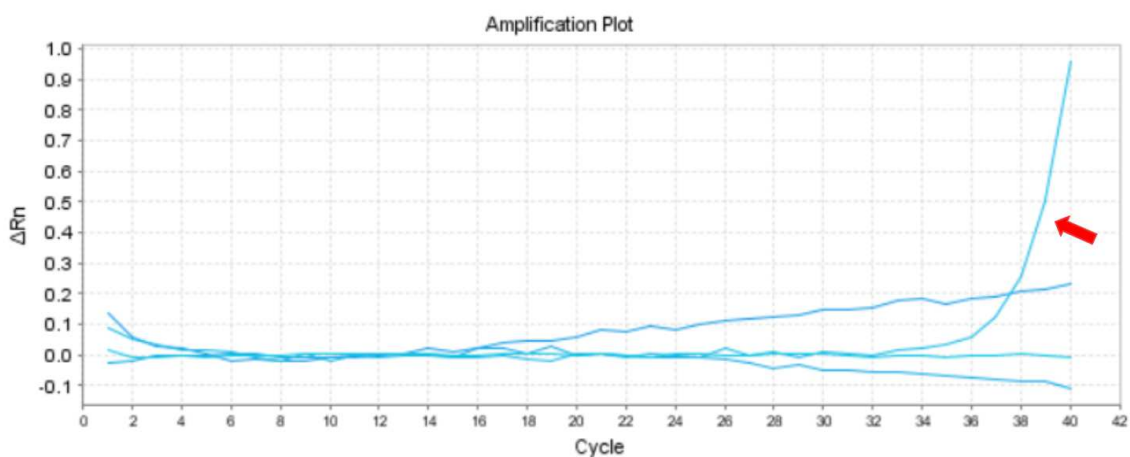


Figura 55 – Gráfico de amplificação resultante do ensaio piloto. A seta vermelha destaca a curva na qual foi observada a amplificação.

5.7.5. Titulação viral

Conforme descrito no tópico 5.7.3., foram realizadas titulações para quantificar as partículas presentes nos estoques virais. A titulação por ensaio de placa utilizando placas de Petri foi realizada. Foi feita uma tentativa de realizar a titulação por ensaios de placa

utilizando placas de seis poços, no entanto, as placas de lise causadas pelo isolado 127 são muito grandes e colabam umas com as outras, impossibilitando assim, a contagem das placas mesmo nas amostras mais diluídas quando utilizadas placas de seis poços (**Figura 56**).

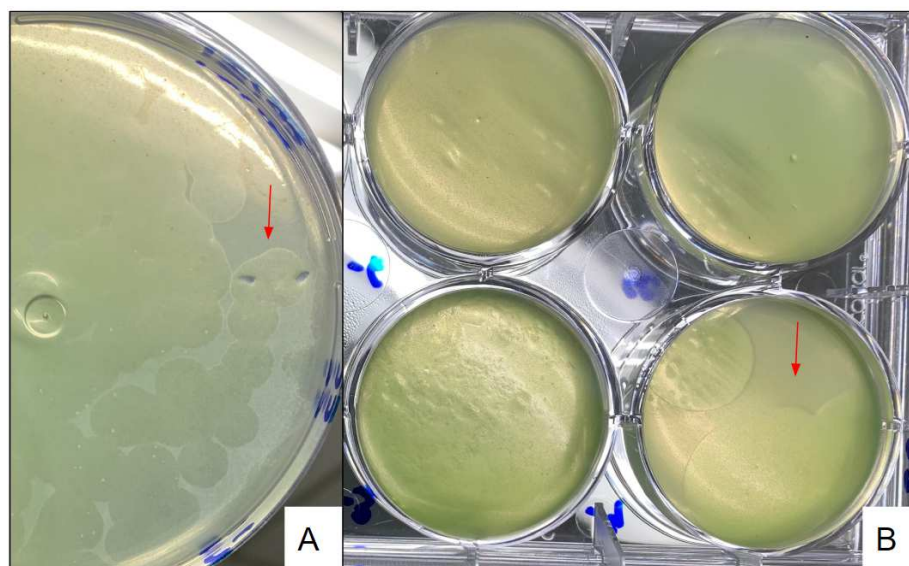


Figura 56 – Grandes placas de lise causadas pelo isolado 127 colabam. Em A: placa de Petri tomada por placas de lise que se uniram. Em B: placas de lise unidas, tomam o poço e impossibilitam a sua contagem. Setas vermelhas destacam placas de lise unidas.

Uma observação importante é a de que as placas de lise formadas pelo isolado 127 aumentam de tamanho rapidamente, portanto é importante realizar a contagem das placas de lise nos tempos de 48 horas pós-infecção e 96 horas pós-infecção (**Figura 57**). É importante realizar duas contagens, uma vez que no tempo 48 horas existem placas de lise claramente definidas e, simultaneamente, regiões de halos indefinidos e de difícil visualização que são indícios de formação de placa de lise. Dessa forma, neste tempo o número de placas pode ser subestimado, e é importante marcar com uma caneta as placas de lise observadas. Para corrigir este problema, uma nova contagem das placas de lise deve ser realizada no tempo 96 horas pós-infecção, pois neste tempo, as placas ficam com as bordas bem definidas, sendo claramente observadas, no entanto, quando o título da amostra está alto, as placas podem colabar, sendo a quantificação dificultada. No entanto, a marcação feita no tempo 48h pós-infecção pode auxiliar na quantificação das placas de lise mesmo que estas estejam unidas 4 dias pós-infecção (**Figura 58**).

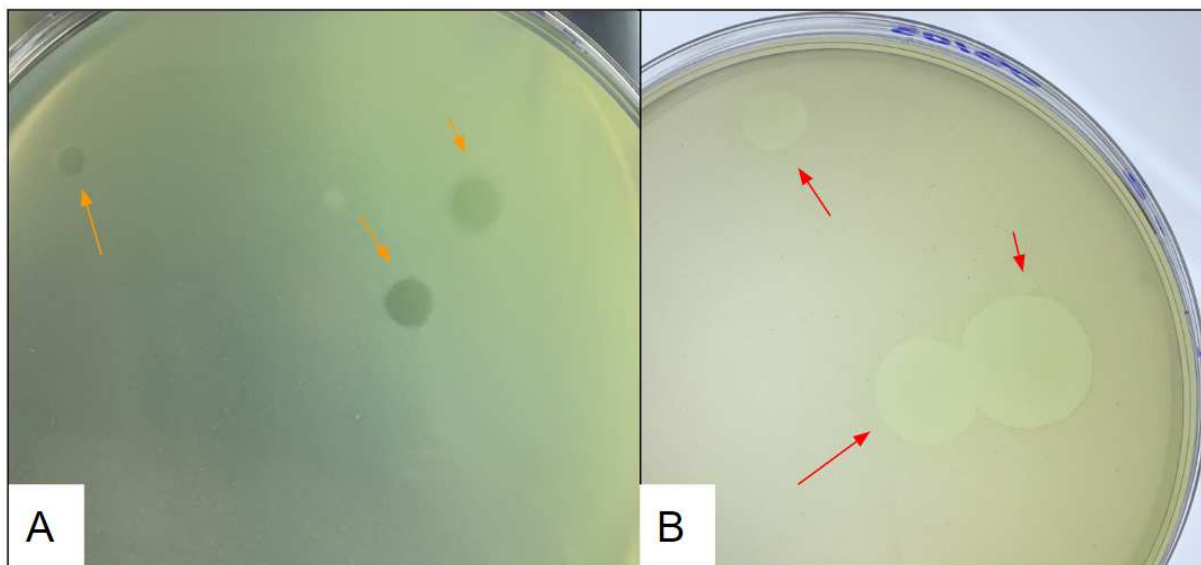


Figura 57 – Tamanho das placas de lise 96 horas pós-infecção e 192 horas pós-infecção. Em A: tamanho das placas de lise 96 horas pós-infecção, setas amarelas indicam as placas de lise; Em B tamanho das placas 192 horas pós-infecção, setas vermelhas indicam as placas de lise.

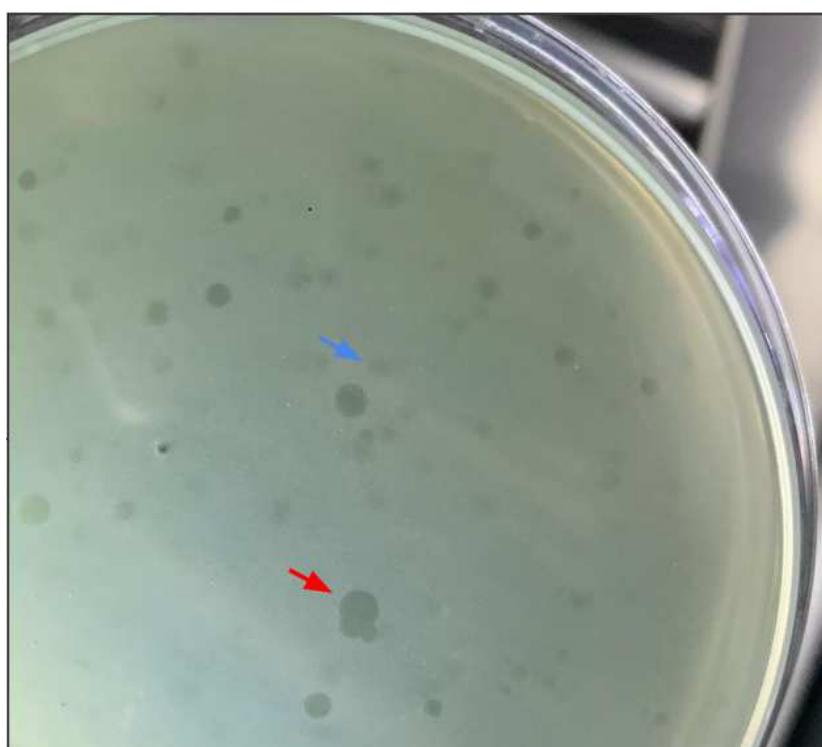


Figura 58 – Tamanho das placas de lise 48 horas pós-infecção. Destacado pela seta vermelha: placa de lise claramente visível. Destacado pela seta azul: indício de início de formação de placa de lise.

O protocolo de titulação por ensaio de placa utilizando o método *double-layer* foi validado utilizando uma solução estoque de PBCV-1 como controle positivo e células de *Chlorella variabilis* NC64A como células hospedeiras. Na diluição de 10^{-8} , apenas uma placa

foi contada, enquanto na diluição de 10^{-6} foram contadas 259 placas, sendo, portanto, esta diluição utilizada para realização dos cálculos. Multiplicando as 259 placas encontradas pelo inverso da diluição (10^6), e pelo fator de diluição (1,1 pois são inoculados 900 μL de amostra nas placas), encontramos o título de $2,85 \times 10^8$ UFP/mL (Figura 59).

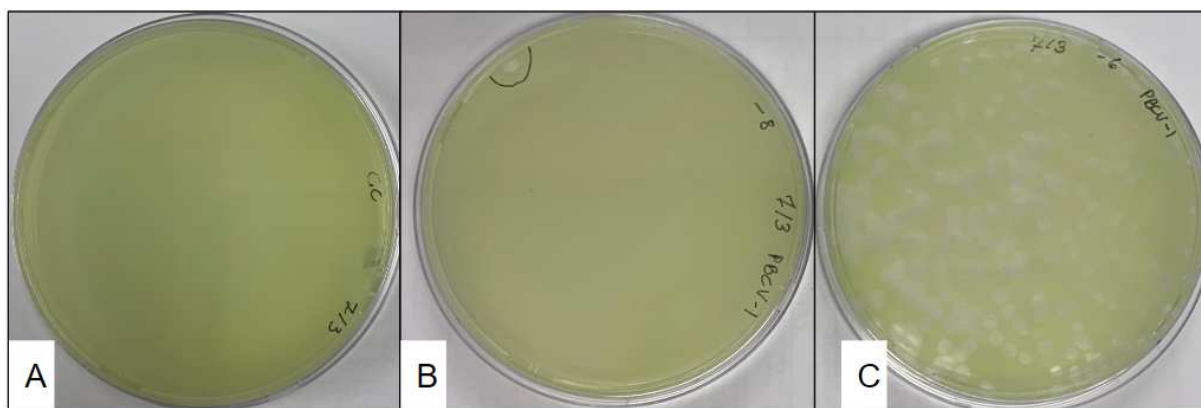


Figura 59 – Validação da titulação por ensaio de placa. Em A: Controle celular no qual não são observadas placas de lise. Em B: Placa de Petri contendo o isolado 127 diluído (diluição de 10^{-8}), na qual apenas uma placa de lise é observada. Em C: Placa de Petri contendo o isolado 127 diluído (diluição de 10^{-6}), na qual 259 placas de lise são observadas.

5.7.6. Avaliação da estabilidade viral

Para avaliar a estabilidade do isolado 127 frente ao congelamento, foram feitos ensaios de placa. Uma placa foi inoculada com o isolado 127 que foi submetido a três rodadas de congelamento e descongelamento e outra placa foi inoculada com o isolado 127 que não passou por congelamento. Placas de lise foram observadas na placa de Petri do isolado 127 que não foi congelado, enquanto não foram observadas placas de lise na placa inoculada com o isolado que passou por congelamento. O isolado 127, não parece ser, portanto, estável quando submetido aos processos de congelamento e descongelamento (**Figura 60**). Este efeito, de perda da infectividade viral após congelamento, já foi descrito por Van Etten e colaboradores (1991) para o chlorovírus PBCV-1. Os chlorovírus ATCV-1 e CVM-1, entretanto, são vírus que resistem ao congelamento, assim como outros nucleocitovírus. O vaccínia vírus, um poxvírus, por exemplo, é capaz de resistir até 15 anos sob congelamento (RHEINBABEN *et al.*, 2007).

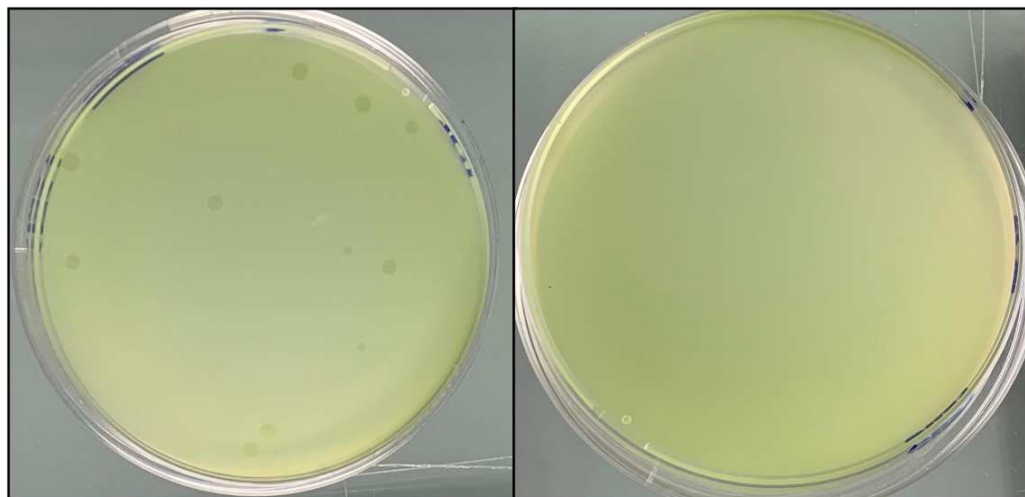


Figura 60 – Efeito do congelamento sobre a infectividade do isolado. À esquerda: placa que foi inoculada com o isolado 127 que não passou por congelamento. É possível observar 11 placas de lise, indicando a viabilidade dos vírus na amostra. À direita: placa que foi inoculada com o isolado 127 que foi submetido a três rodadas de congelamento e descongelamento. A ausência de placas de lise indica a sensibilidade viral frente ao congelamento.

5.7.7. Caracterização de efeito citopático em *Chlorella vulgaris*: Microscopia óptica

Após a rodada de expansão mostrada da **Figura 56**, os tubos foram centrifugados, os pellets coletados, colocados sobre lâminas e analisados sob microscópio óptico (aumento de 1000x). Quando analisamos as células infectadas pelo isolado 127, foi possível observar, assim como visto nos tubos falcons, a formação de grandes aglomerados de células (**Figura 61**, imagem C). Além disso, corpos palmelóides e células gigantes de *Chlorella* também foram identificadas nas lâminas das células infectadas. Quando observadas as lâminas no menor aumento (40x), a formação dos grumos de células é ainda mais evidente quando comparadas ao controle celular.

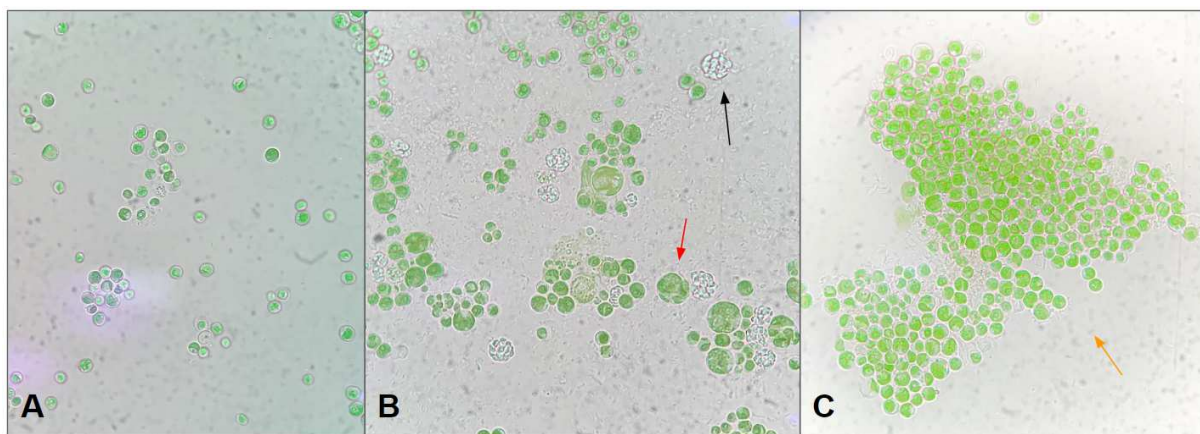


Figura 61 – Caracterização do efeito citopático do isolado 127. Em A: Células não infectadas. Em B e C: Células infectadas pelo isolado 127, onde a seta vermelha destaca uma célula gigante de *Chlorella*, a seta preta indica um corpo palmelóide, e a seta amarela mostra um grande aglomerado de células.

A formação de corpos palmelóides e de células gigantes é observada, geralmente, quando há presença de altas concentrações de glicose (HIGASHIYAMA, 1967). Este efeito pode ter sido observado nas células infectadas devido à liberação de moléculas de glicose no meio após lise das células causada pelo isolado 127, ou pode ter sido induzido diretamente pelo isolado por algum mecanismo desconhecido.

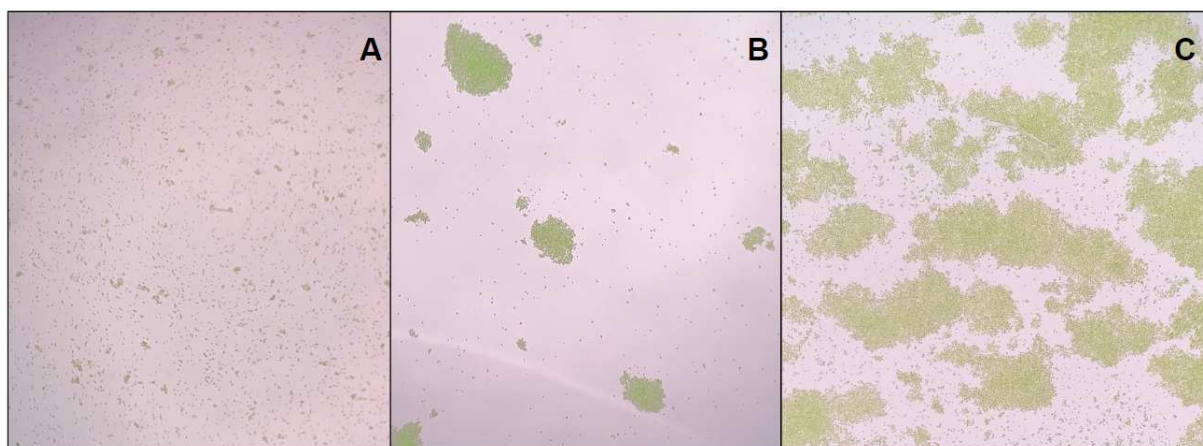


Figura 62 – Aspecto geral das células infectadas pelo isolado 127. Em A: Células não infectadas: não são observados grandes aglomerados celulares. Em B e C: células infectadas pelo isolado 127 em grandes aglomerados de celulares.

Conforme as células vão ficando mais antigas, o efeito de floculação pode ser observado, no qual as cargas negativas das células vão se dissipando e o efeito de repulsão eletrostática é diminuído, fazendo com que as células formem pequenos aglomerados (BRANIKOVA *et al.*, 2018). Nossas observações, entretanto, mostram efeito de aglomeração das células considerável e muito diferente do observado para as células não infectadas. A

formação desses aglomerados de células já foi descrita em células de amebas infectadas por tupanvírus. A infecção viral aumenta a produção de transcritos de *mannose-binding protein* (MBP), uma adesina das amebas. Dessa forma as células infectadas se aderem às células não infectadas formando agregados celulares que resultam na formação de um “cacho” de células. A formação dessas estruturas força a aproximação de células não infectadas e células infectadas, facilitando assim a disseminação do vírus por todas as células (OLIVEIRA *et al.*, 2019). É possível que tal mecanismo também ocorra para vírus de algas, hipótese esta que precisa ser investigada em trabalhos futuros.

5.8. Caracterização dos efeitos citopáticos: microscopia eletrônica de transmissão

Para definir qual o melhor protocolo para o preparo das amostras a serem analisadas posteriormente por microscopia eletrônica de transmissão, diferentes estratégias foram testadas. Não foram observadas diferenças significativas entre as micrografias obtidas empregando os diferentes protocolos, portanto, a variação no tempo de fixação testada não parece influenciar no resultado final das micrografias, assim como a variação do tempo no banho ultrassônico testada. Em todas as micrografias é possível notar que as organelas e estruturas celulares estão bem resolvidas, possibilitando visualizar com clareza as micrografias de todas as amostras (**Figura 63**). O protocolo selecionado foi, portanto, o de execução mais facilitada, no qual as amostras passam por apenas quatro horas de fixação e o tempo total no banho ultrassônico de apenas um minuto e trinta segundos.

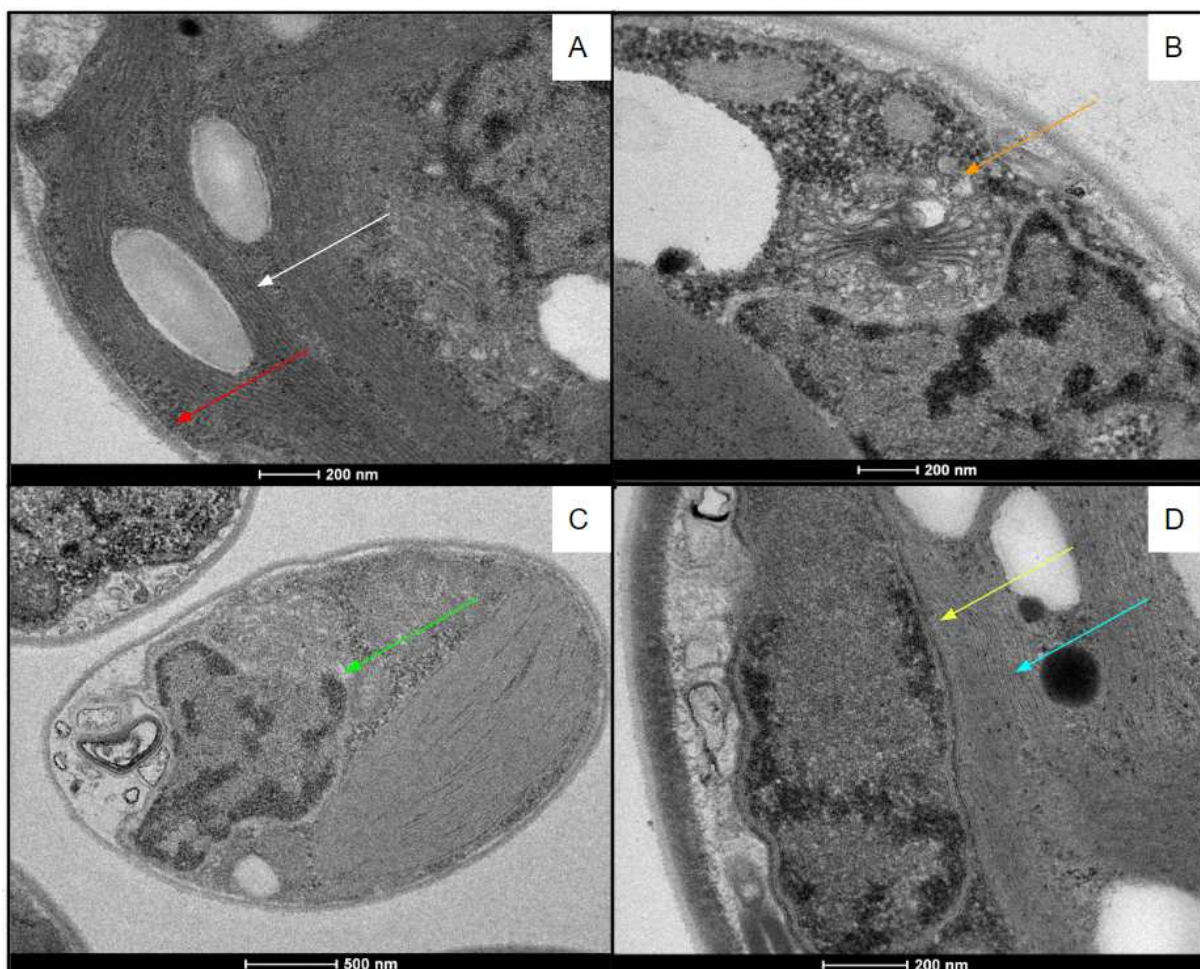


Figura 63 – Diferentes protocolos de preparo das amostras geram micrografias com boa resolução. Em A: foi usado o protocolo que requer 4 horas de fixação. A seta branca destaca a clareza com que os tilacóides são visualizados, enquanto a seta vermelha destaca a alta resolução da parede celular. Em B: protocolo que requer 24 horas de fixação. A seta laranja aponta para um complexo de Golgi que pode ser facilmente visualizado devido à alta resolução da micrografia. Em C: protocolo que requer 16 horas de fixação. A seta verde destaca o núcleo no qual é possível enxergar a regiões nas quais a cromatina é mais condensada. Em D: protocolo que requer 48 horas de fixação. A seta amarela destaca o núcleo no qual é possível enxergar a regiões de cromatina condensada, a seta azul destaca a clareza com que os tilacóides são visualizados.

O protocolo escolhido foi usado para preparar amostras contendo células de *Microcystis aeruginosa* e *Chlorella variabilis* NC64A não infectadas, visando avaliar se tal metodologia funcionaria também com estas células. De forma semelhante, as micrografias ficaram com alta resolução, de forma que a visualização das ultraestruturas celulares foi possibilitada (Figura 64 a 66).

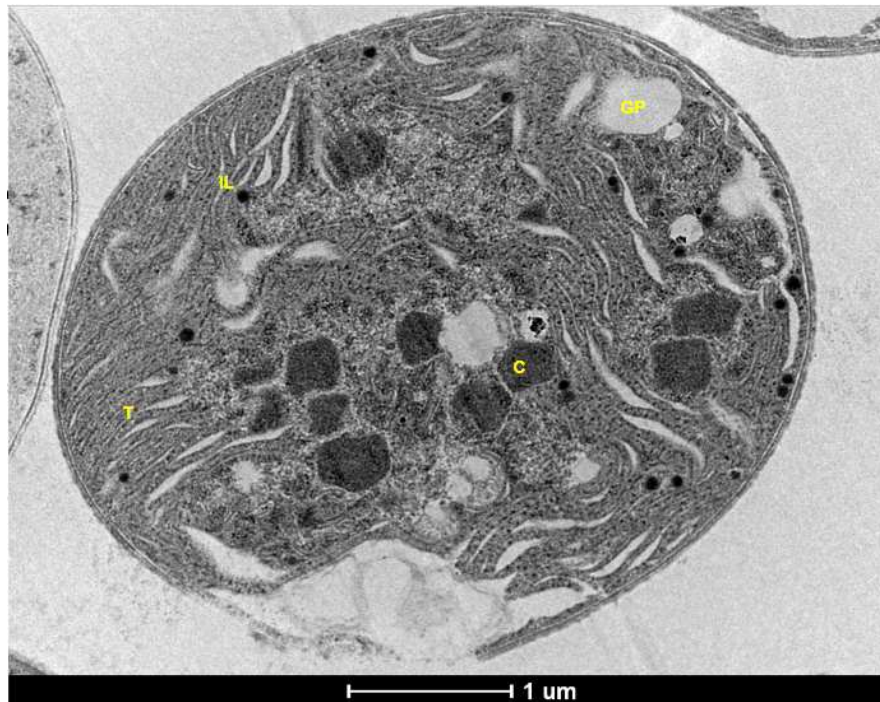


Figura 64 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Microcystis aeruginosa*. Micrografia de uma célula de *Microcystis aeruginosa* destacando: T = Tilacóides; GP = Grânulo de Polifosfato; CB = Carboxissomos; IL = Inclusão lipídica.

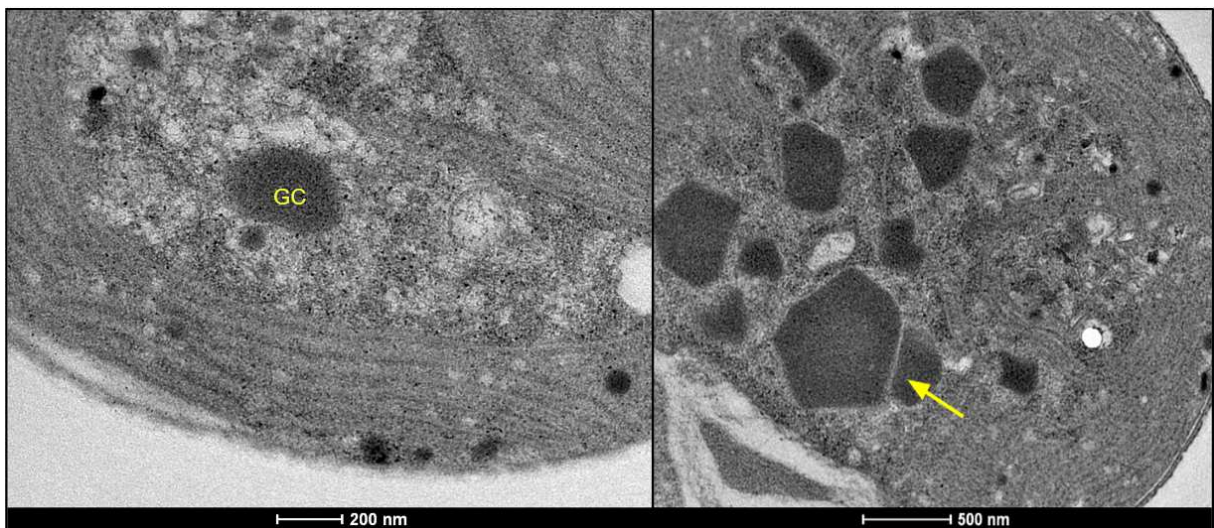


Figura 65 – Detalhe das estruturas celulares de *Microcystis aeruginosa*. À esquerda: Grânulo de cianoficina = GC. À direita: destacado pela seta amarela, um carboxissomo.

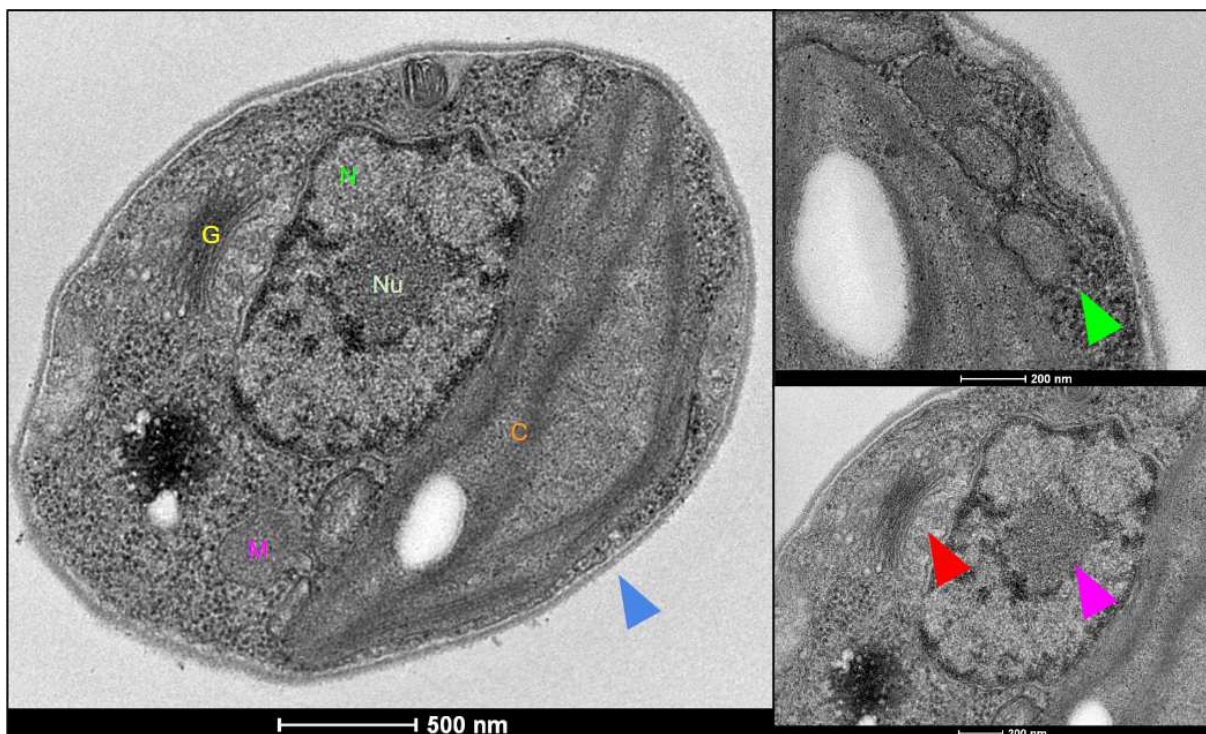


Figura 66 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Chlorella variabilis* NC64A. À esquerda, célula típica de *Chlorella variabilis* NC64A. N = Núcleo; Nu= Nucléolo; G= Complexo de Golgi; C= Cloroplasto; M= Mitocôndria. Triângulo azul escuro aponta para a parede celular. À direita: triângulo verde aponta para uma mitocôndria em detalhe; triângulo vermelho aponta para o complexo de Golgi em detalhe; triângulo rosa aponta para o nucléolo em detalhe.

Células de *Microcystis aeruginosa* não infectadas (controles) e infectadas pelo isolado 7 também foram fixadas, enviadas para o Centro de Microscopia e analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão. Nas micrografias fica evidente que o aspecto geral das células infectadas é diferente das células controle. De maneira geral as células aparentam estar menos elétron-densas e com o citoplasma maior, comprimindo, assim, os tilacóides (**Figura 67**).

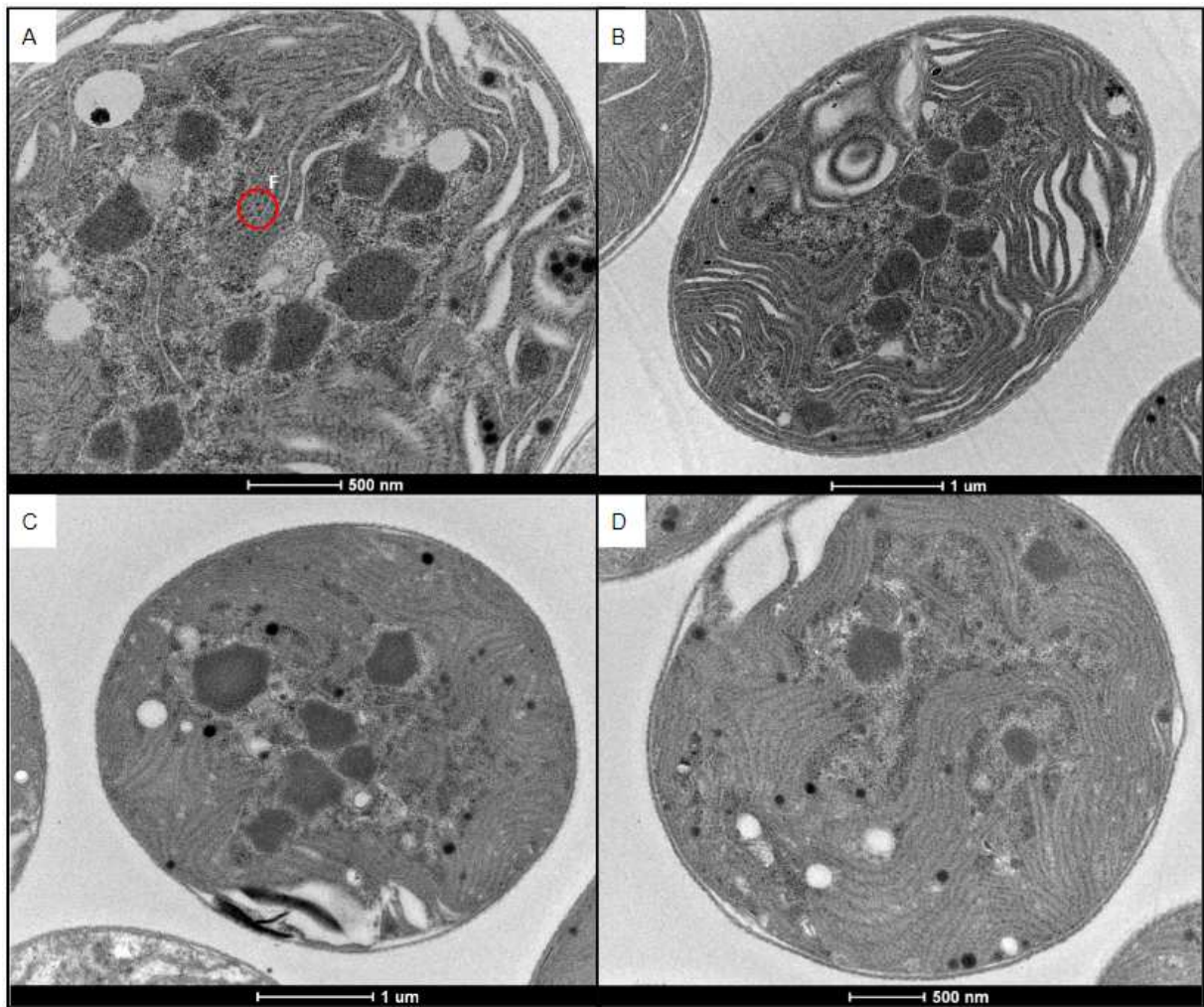


Figura 67 – Aspecto geral das células não infectadas e infectadas. Em A e B: Células não infectadas. Destacados pelo círculo vermelho: ficobilissomos, evidenciando que o uso deste protocolo permite a visualização até das menores estruturas celulares. Em C e D: células infectadas.

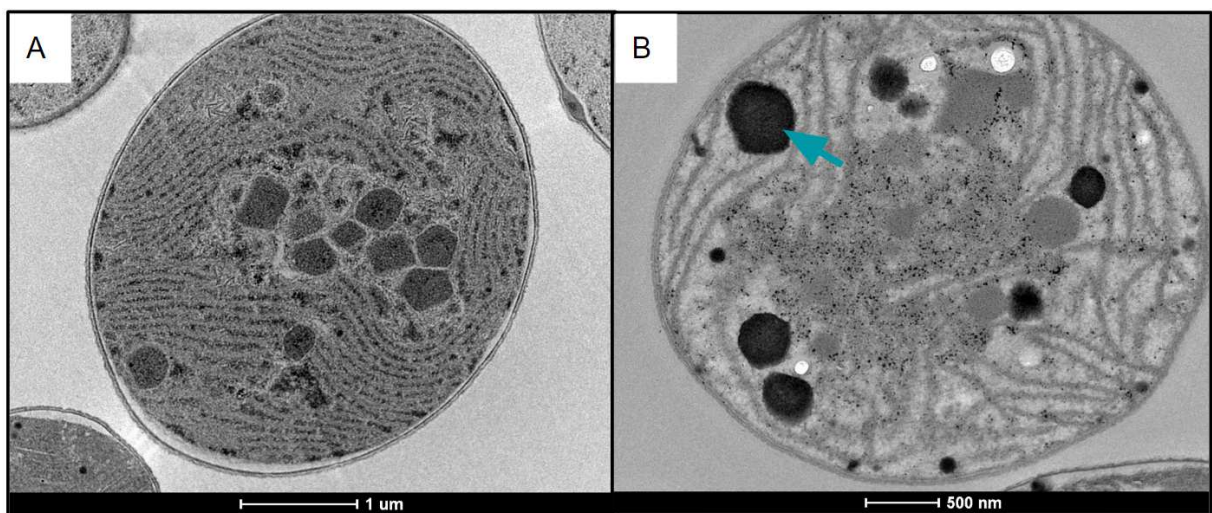


Figura 68 – Micrografias eletrônicas de células de *Microcystis aeruginosa* infectadas comparadas às células não infectadas. Em A: célula de *Microcystis* não infectada. Em B: célula de *Microcystis* infectada na qual são

observados pontos muito elétron-densos na região central da célula; a seta verde indica uma inclusão lipídica de tamanho anormal.

Na **Figura 68**, é possível observar as diferenças entre as células infectadas pelo isolado 127, e as células não infectadas. Os tilacóides da célula infectada apresentam-se desorganizados e afastados uns dos outros, de forma que parece que estão sendo degradados, além disso, grandes inclusões de lípidos podem ser observadas nestas células. Entretanto, o aspecto das células infectadas que mais chama atenção, são pontos muito elétron-densos, os quais se assemelham aos encontrados em células infectadas descritas na literatura (NAKNAEN *et al.*, 2021). Naknaen e colaboradores (2021) descrevem que em células infectadas por cianófagos, são encontrados pontos altamente elétron-densos (**Figura 68**, imagem B), que são partículas semelhantes a vírus, VLPs. Em nossas células infectadas pelo isolado 7S é possível identificar estruturas muito similares (**Figura 68**, imagem B), o que indica que partículas semelhantes a vírus podem estar presentes nas células infectadas, podendo este ser o primeiro cianófago que infecta *Microcystis aeruginosa* a ser isolado no Brasil.

Para caracterização dos efeitos citopáticos causados pelo isolado 127 nas células de *Chlorella vulgaris*, foram feitas micrografias mostrando o aspecto geral das células. Nos quadros controle (**Figura 69**, A e B), poucos restos celulares são observados, enquanto foi possível observar certa homogeneidade no tamanho e aspecto das células. Já nos quadros das células infectadas (**Figura 69**, C-F) é possível identificar muitos restos celulares, grande variabilidade no tamanho, formato e aspecto das células.

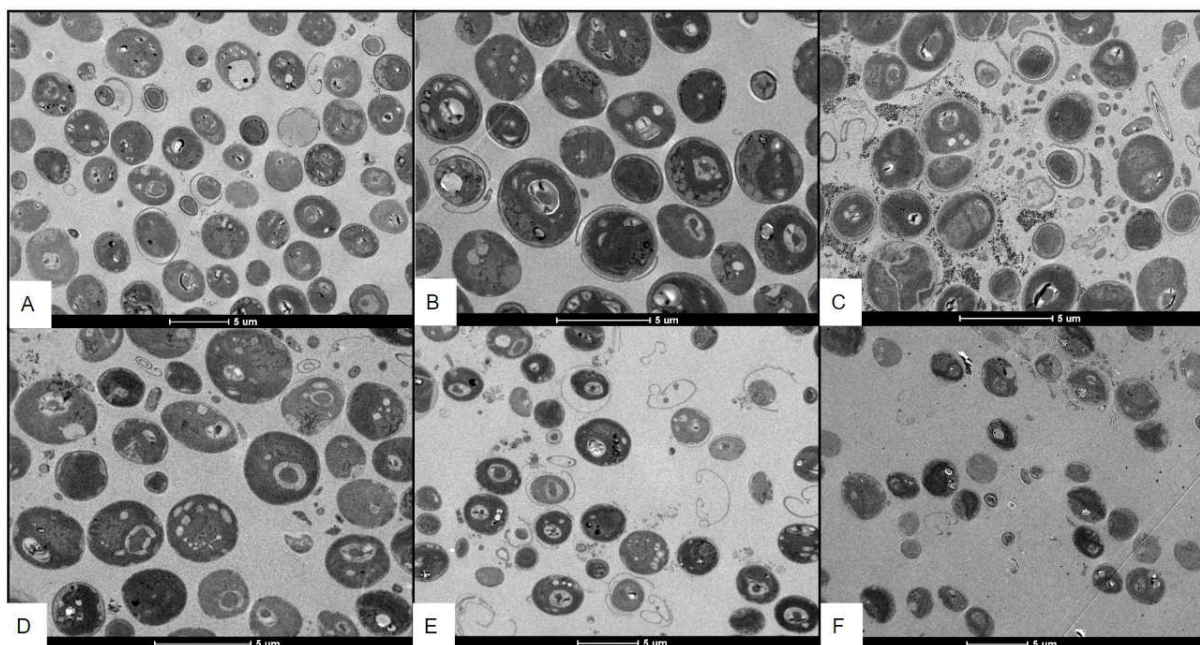


Figura 69 – Aspecto geral das células infectadas pelo isolado 127 comparado ao aspecto geral dos controles celulares. Em A e B: células de *Chlorella vulgaris* não infectadas. Em C-F: células de *Chlorella vulgaris* infectadas.

Considerando a forma que as células de *Chlorella* se reproduzem, o rompimento da parede celular é fundamental para a liberação das células filhas. Dessa forma, não seria espantoso encontrar restos de parede celular nas micrografias de *Chlorella*. No entanto, nas micrografias das células infectadas, um volume aumentado de restos de parede celular é observado (**Figura 70**).

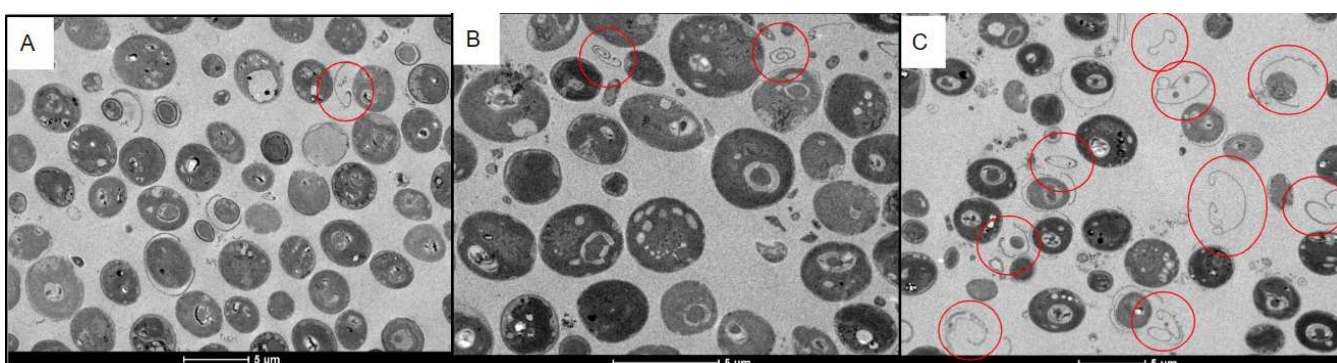


Figura 70 – Restos de parede celular sendo evidenciados. Em A: células de *Chlorella* não infectadas. Em B: células de *Chlorella* infectadas, 5 dias pós-infecção. Em C: células de *Chlorella* infectadas, 7 dias pós-infecção.

Destacados pelos círculos vermelhos estão os restos de paredes celulares..

Uma micrografia de uma célula não infectada típica de *Chlorella vulgaris* foi selecionada como controle celular (**Figura 71**) para fins comparativos. Nela observamos com clareza as

estruturas celulares, incluindo um núcleo típico, um grande cloroplasto, grânulos de amido, um pirenóide no cloroplasto, mitocôndrias, parede celular, e grandes gotas de lipídios.

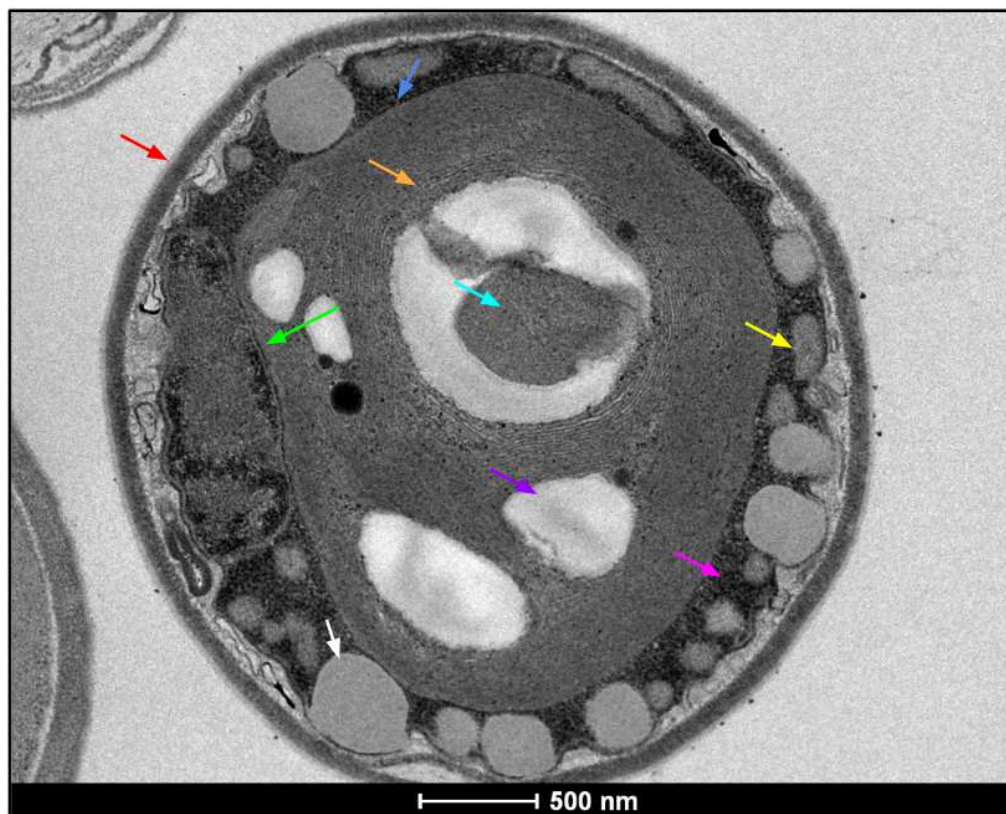


Figura 71 – Micrografia eletrônica de uma célula de *Chlorella vulgaris* não infectada. Seta verde: núcleo; seta alaranjada: tilacóides; seta roxa: grânulos de amido; seta ciano: pirenóide no cloroplasto; seta azul clara: cloroplasto; seta branca: gotas de lipídeos; seta vermelha: parede celular; seta amarela: mitocôndrias; seta rosa: citoplasma.

Sheng e colaboradores (2022) mostraram pela primeira vez uma micrografia de um mimivírus que infecta *Chlorella* de vida livre cujo centro de montagem está localizado nos cloroplastos. Neste trabalho encontramos estruturas muito similares às partículas virais descritas nos cloroplastos das células não infectadas (**Figura 72**). Pode ter ocorrido contaminação das células do controle celular pelo isolado 127, embora seja mais provável que estas estruturas observadas sejam plastoglóbulos, estruturas encontradas nos cloroplastos das células. Plastoglóbulos são gotículas esféricas pequenas (diâmetro: 30-100 nm) de material lipídico e elétron-densas que estão localizadas entre os tilacóides. Os plastoglóbulos funcionam como um reservatório de lipídios dentro do cloroplasto, mas podem conter também proteínas (SOLYMOSSI, 2012).

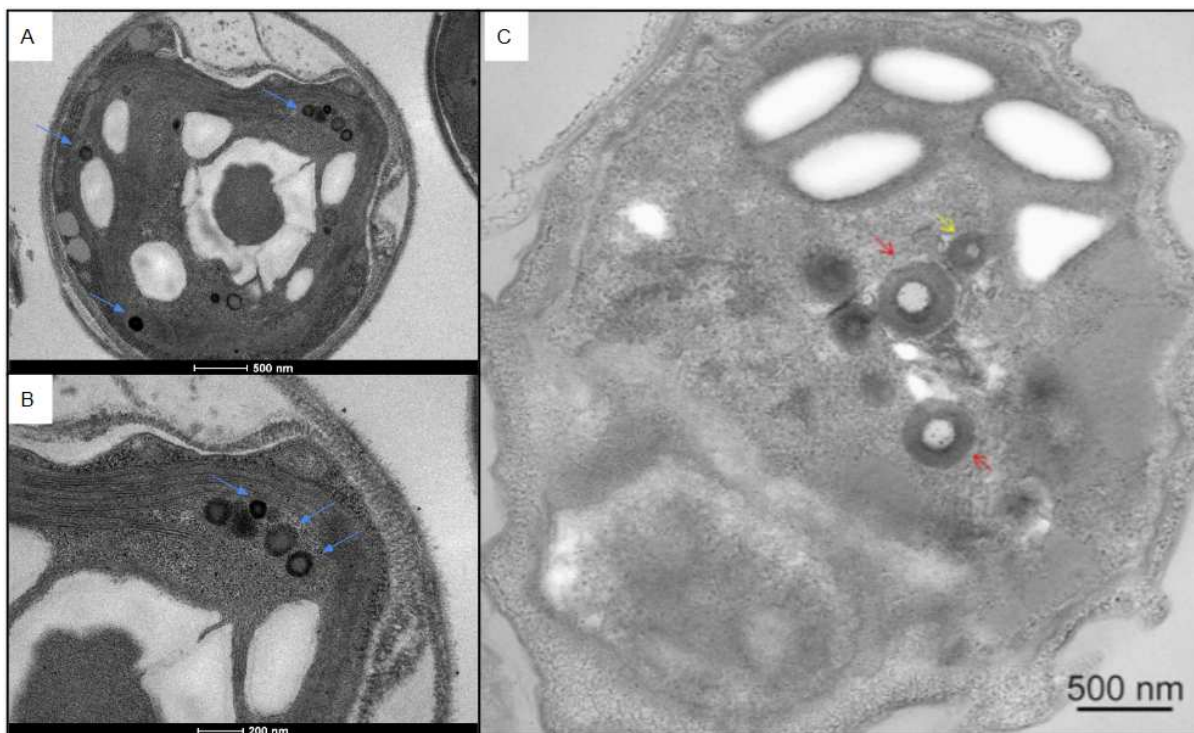


Figura 72 – Estruturas semelhantes a plastoglóbulos vistas no controle celular e descritas na literatura. Em A e B: Célula não infectada onde são observadas estruturas semelhantes à plastoglóbulos. Em C: estruturas descritas por Sheng e colaboradores (2022) como partículas virais que se assemelham, também, a palstoglóbulos.

Fonte: quadro C, SHENG *et al* 2022.

É possível ver muitas estruturas muito semelhantes aos plastoglóbulos descritos por Solymosi (2012) na **Figura 73**.

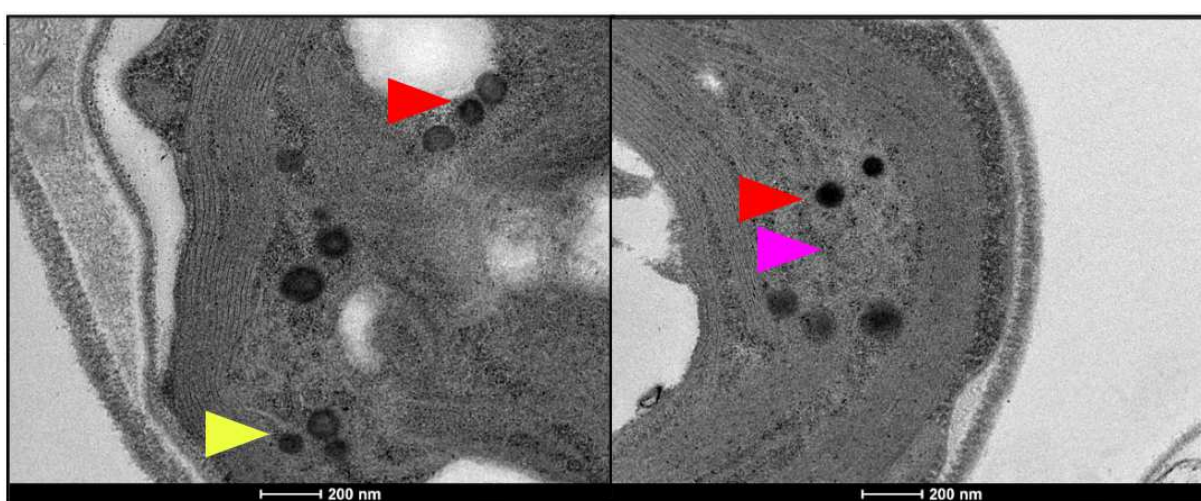


Figura 73 – Estruturas semelhantes a platoglóbulos no cloroplasto de células infectadas (4 dias pós-infecção). Setas vermelhas: indicam estruturas pequenas e bastante elétron-densas; seta amarela: indica estruturas mais elétron-lucentes; seta rosa: aponta para região na qual os tilacóides aparentam estar afrouxados.

Em todas as amostras contendo células infectadas pelo isolado 127 são detectadas invaginações nas regiões entre a parede celular e o citoplasma, nas quais são observadas estruturas de aspecto membranoso e por vezes geométrico que se assemelham a centros de montagem de chlorovírus (**Figuras 74 e 75**). Entretanto, a localização dessas estruturas não corrobora com essa hipótese, uma vez que os centros de montagem de chlorovírus são normalmente encontrados no citoplasma (VAN ETEN *et al.*, 2020). Sendo assim, não é possível tirar conclusões tendo como base apenas os dados obtidos até o momento. Este padrão, presença de regiões de invaginações com estruturas geométricas que se assemelham aos centros de montagem de chlorovírus, se repete em diversas amostras.

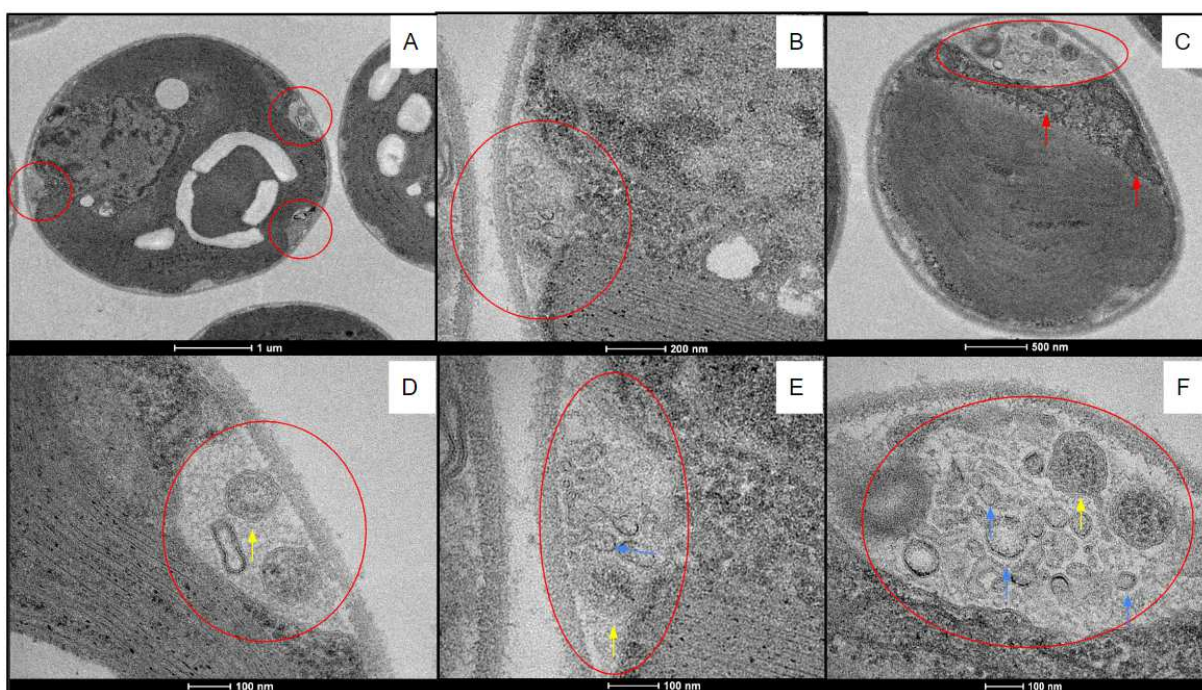


Figura 74 – Regiões de invaginações entre o citoplasma e a parede celular com estruturas semelhantes a centros de montagem de chlorovírus. Em A-F: células de *Chlorella vulgaris* infectadas pelo isolado 127, 5 dias pós-infecção. Círculos vermelhos destacam essas regiões de invaginação semelhantes aos centros de montagem dos chlorovírus; setas azuis destacam estruturas geométricas semelhantes à VLPs; setas amarelas destacam estruturas semelhantes à mitocôndrias.



Figura 75 - Estruturas semelhantes aos centros de montagem. Em A, B e C: *Chlorella* infectada pelo isolado 127, 7 dias pós-infecção. Círculo amarelo: envaginação da célula vizinha; seta vermelha: indica resto de parede celular; círculos vermelhos: destacam regiões semelhantes aos centros de montagem.

Ainda, na amostra infectada pelo isolado 127, 5 dias pós-infecção, foram encontradas células descaracterizadas, sem estruturas celulares típicas visíveis, com regiões no citoplasma que também se assemelham às fábricas virais de chlorovírus descritas na literatura (**Figura 76**) (MILROT et al., 2015). Porém não são vistas estruturas elétron-densas, características de partículas virais maduras.

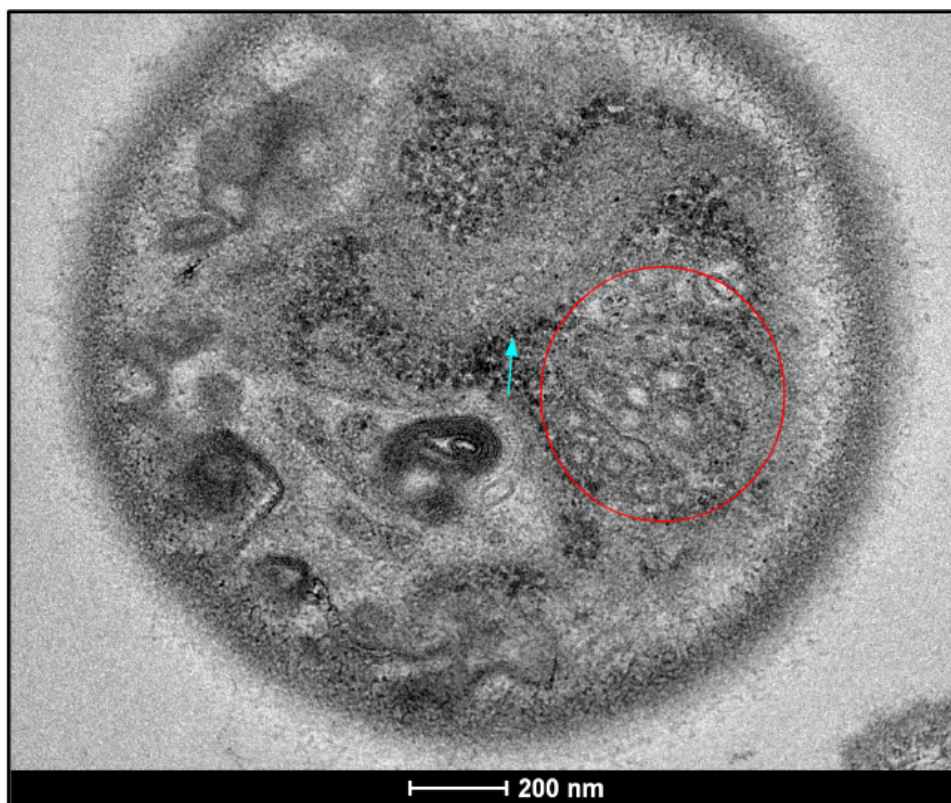


Figura 76 – Região no citoplasma semelhante ao centro de montagem dos chlorovírus comparada a um centro de montagem. Em A: *Chlorella vulgaris* infectada pelo isolado 127. Círculo destaca: região no citoplasma semelhante ao centro de montagem dos chlorovírus; seta azul destaca o cloroplasto de tamanho reduzido.

Foi levantada a hipótese de que estas estruturas observadas poderiam ser vacúolos autofágicos. Entretanto, estes vacúolos nas células de *Chlorella* são morfologicamente muito distintos das estruturas observadas neste trabalho (JIANG *et al.*, 2012).

Os resultados apresentados não são suficientes para concluir que a estruturas repetitivas apresentadas são fábricas virais/centros de montagem do isolado 127, uma vez que a formação destes nunca foi vista antes acontecendo fora do citoplasma. Entretanto, devido à natureza inédita destes vírus que infectam *Chlorellas* de vida livre, é possível que as estruturas observadas sejam de fato fábricas virais do isolado obtido. Pode ser a primeira vez em que centros de montagem de vírus que infectam algas do gênero *Chlorella* são observados fora do citoplasma. Novas investigações devem ser conduzidas visando avaliar a natureza do isolado 127 e seus efeitos citopáticos causados na célula.

6. CONCLUSÕES

6.1. As condições ideais para cultivo, subcultivo e manutenção das células de diferentes espécies de clorélas e *Microcystis aeruginosa* foram encontradas e estabelecidas;

6.2. Foram estabelecidos protocolos adequados para a realização de prospecção de vírus em amostras ambientais, triagem de amostras ambientais, isolamento viral, purificação das placas de lise, produção de estoques virais e titulação viral por duas diferentes técnicas;

6.3. Foi obtido um isolado, denominado 127, capaz de formar placas de lise em células de *Chlorella vulgaris*, além de causar aglomeração das células hospedeiras (observada micro e macroscopicamente), e de gerar alterações morfológicas significativas nas células (efeitos citopáticos);

6.4. O isolado 127 (que infecta *Chlorella vulgaris*), não é estável quando submetido aos processos de congelamento e descongelamento, e deve, portanto, ser armazenado sob refrigeração, nunca congelado.

6.5. Foi obtido um isolado, denominado 7S, que induz estiolamento das culturas de *Microcystis aeruginosa*, provoca lise celular e alterações morfológicas significativas nas células (efeitos citopáticos), sendo observadas, inclusive partículas semelhantes a vírus nas células infectadas por esse isolado por meio de microscopia eletrônica de transmissão;

6.6. Após a realização de análises comparativas genômicas e filogenéticas de fagos que infectam cianobactérias do gênero *Microcystis*, pode-se concluir que este grupo de vírus é parafilético e seus genomas variam substancialmente sob diversos aspectos, incluindo %GC, presença de genes de tRNA, tamanho do genoma, quantidade de CDS e topologia do genoma, não existindo blocos sintênicos conservados nem COGs compartilhados entre todos os cianófagos; Dessa forma, a obtenção de novos isolados é necessária para auxiliar no preenchimento das lacunas na história evolutiva deste grupo.

6.7. Foi estabelecido um protocolo de preparo de amostras para Microscopia Eletrônica de Transmissão que fornece imagens bem resolvidas e pode ser usado para todas as células testadas.

7. PERSPECTIVAS

7.1. Desenhar novos primers para realizar a padronização da técnica de qPCR para ser usada na prospecção de amostras ambientais;

7.2. Analisar os isolados 127 e 7S por Microscopia Eletrônica de Transmissão, visando conhecer o tamanho das partículas virais;

7.3. Conhecendo o tamanho da partícula viral, realizar a produção e purificação dos isolados 127 e 7S;

7.4. Após purificação dos isolados 127 e 7S, sequenciar os genomas para conhecer as características genéticas destes isolados;

7.5. Fazer novas curvas de crescimento das culturas de células que formam aglomerados por espectrofotometria.

8. REFERÊNCIAS

- ABALDE, J.; BETANCOURT, L.; TORRES, E.; CID, A. & BARWELL, C. Purification and characterization of phycoyanin from the marine cyanobacterium *Synechococcus* sp. IO9201. **Plant Science**, v. 136: 109-120, 1998.
- AGARKOVA, I., HERTEL, B., ZHANG, X., LANE, L., TCHOURBANOV, A., DUNIGAN, D. D., THIEL, G., ROSSMANN, M. G., & VAN ETTEN, J. L. Dynamic attachment of Chlorovirus PBCV-1 to *Chlorella variabilis*. **Virology**, 466-467, 95–102, 2014.
- AGARKOVA, I.V., LANE, L.C., DUNIGAN, D.D., QUISPE, C.F., DUNCAN, G.A., MILROT, E., MINSKY, A., ESMAEL, A., GHOSH, J.S., VAN ETTEN, J.L. Identification of a Chlorovirus PBCV-1 Protein Involved in Degrading the Host Cell Wall during Virus Infection. **Viruses**, 13, 782, 2021.
- AHERFI, S., LA SCOLA, B., PAGNIER, I., RAOULT, D., & COLSON, P. The expanding family Marseilleviridae. **Virology**, 466-467, 27–37, 2014.
- ANDRADE, A. C. D. S. P., ARANTES, T. S., RODRIGUES, R. A. L., MACHADO, T. B., DORNAS, F. P., LANDELL, M. F., FURST, C., BORGES, L. G. A., DUTRA, L. A. L., ALMEIDA, G., TRINDADE, G. S., BERGIER, I., ABRAHÃO, W., BORGES, I. A., CORTINES, J. R., DE OLIVEIRA, D. B., KROON, E. G., & ABRAHÃO, J. S+. Ubiquitous giants: a plethora of giant viruses found in Brazil and Antarctica. **Virology journal**, 15(1), 22, 2018.
- ARIENOVÁ, S., SCHRAMLOVÁ, J., AMBROZOVA, H., MARESOVÁ, V., & HOLUB, M. Electron microscopy in the diagnosis of viral gastroenteritis in hospitalised children in the Czech Republic. **Folia microbiologica**, 57(3), 177–182, 2012.
- AYLWARD, F. O., MONIRUZZAMAN, M., HA, A. D., KOONIN, E. V. (2021) A phylogenomic framework for charting the diversity and evolution of giant viruses. **PLoS Biol**, [s. l.], 19(10): e3001430, 2021.
- AYLWARD, F.O., ABRAHÃO, J.S., BRUSSAARD, C.P. et al. Taxonomic update for giant viruses in the order Imitervirales (phylum Nucleocytoviricota). *Arch Virol* 168, 283, 2023.
- BAJGUZ, A., & DINAN, L. Effects of ecdysteroids on *Chlorella vulgaris*. **Physiologia Plantarum**, 121(3), 349-357, 2004.
- BATINOVI, S., WASSEF, S., KNOWLER, S. A., RICE, D. T. F., STANTON, C. R., ROSE J., TUCCI, J., NITTAMI, T., VINH, A., DRUMMOND, G. R., SOBEY, C. G., CHAN, H. T., SEVIOUR, R. J., PETROVSKI, S., FRANKS, A. E., Bacteriophages in Natural and Artificial Environments. **Pathogens**, [s. l.], 8, 100, 2019.
- BAWDEN, F., PIRIE, N., BERNAL, J., FANKUCHEN, I. Liquid Crystalline Substances from Virus-infected Plants. **Nature** 138, 1051–1052, 1936.

BEIJERINCK, M. W. Ueber ein Contagium vivum fluidum als Ursache der Fleckenkrankheit der Tabaksblätter. **Verh. Kon. Akad. Wetensch.**, 5, 3-21, 1898.

BELHAOUARI, D. B., DE SOUZA, G. A. P., LAMB, D. C., KELLY, S. L., GOLDSTONE, J. V., STEGEMAN, J. J., COLSON, P., LA SCOLA, B., AHERFI, S. Metabolic arsenal of giant viruses: Host hijack or self-use? **eLife**, [s. l.], 11:e78674. 2022.

BELLAS C, HACKL T, PLAKOLB MS, KOSLOVÁ A, FISCHER MG, SOMMARUGA R. Large-scale invasion of unicellular eukaryotic genomes by integrating DNA viruses. **Proc Natl Acad Sci** 120(16), 2023.

BISHOP, R. F., DAVIDSON, G. P., HOLMES, I. H., & RUCK, B. J. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. **Lancet**, London, England, 2(7841), 1281–1283, 1973.

BORATTO, P. V. M., SERAFIM, M. S. M., WITT, A. S. A., CRISPIM, A. P. C., AZEVEDO, B.L.d., SOUZA, G. A. P. d., AQUINO, I. L. M. d., MACHADO, T. B., QUEIROZ, V. F., RODRIGUES, R. A. L., et al. A Brief History of Giant Viruses' Studies in Brazilian Biomes. **Viruses**, [s. l.], 14, 191, 2022.

BRANYIKOVA, I., FILIPENSKA, M., URBANOVA, K., RUZICKA, M. C., PIVOKONSKY, M., & BRANYIK, T. Physicochemical approach to alkaline flocculation of *Chlorella vulgaris* induced by calcium phosphate precipitates. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 166, 54-60, 2018.

CAI, R., LI, D., LIN, W., QIN, W., PAN, L., WANG, F., QIAN, M., LIU, W., ZHOU, Q., ZHOU, C., & TONG, Y. Genome sequence of the novel freshwater *Microcystis* cyanophage Mwe-Yong1112-1. **Archives of virology**, 167(11), 2371–2376, 2022.

CECCHIN, M., MARCOLUNGO, L., ROSSATO, M., GIROLOMINI, L., COSENTINO, E., CUINE, S., et al. *Chlorella vulgaris* genome assembly and annotation reveals the molecular basis for metabolic acclimation to high light conditions. **Plant J.**, [s. l.], 100(6):1289–305, 2019.

CHEN, S., ZHOU, Y., CHEN, Y., GU, J., fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, **Bioinformatics**, [s. l.], Volume 34, Issue 17, Pages i884–i890, 2018.

CHO, H. H., PARK, H. H., KIM, J. O., CHOI, T. J. Isolation and characterization of *Chlorella* viruses from freshwater sources in Korea. **Molecules and cells**, [s. l.], 14(2), 168–176, 2002.

COUTINHO, Leopoldo Magno. **Biomias Brasileiros**. São Paulo: Oficina de Textos, 2016.

CRONBERG G, CARPENTER EJ, C ARMICHAEL WW. Taxonomy of harmful cyanobacteria. In: Hallegraef GM, Anderson DM, Cembella AD (eds.), *Manual on Harmful Marine Microalgae*. **Unesco Publishing** pp. 523-562, 2003.

DAVIS, M. W., JORGENSEN, E. M. ApE, A Plasmid Editor: A Freely Available DNA Manipulation and Visualization Program. *Front. Bioinform.* 2:818619, 2022.

DE OLIVEIRA SANTOS, L., GUEDES, I. A., AZEVEDO, S. M. F. O. E., & PACHECO, A. B. F. Occurrence and diversity of viruses associated with cyanobacterial communities in a Brazilian freshwater reservoir. **Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]**, 52(2), 773–785, 2021.

DE OLIVEIRA, E. G., CARVALHO, J. V. R. P., BOTELHO, B. B., DA COSTA FILHO, C. A., HENRIQUES, L. R., DE AZEVEDO, B. L., & RODRIGUES, R. A. L. Giant Viruses as a Source of Novel Enzymes for Biotechnological Application. **Pathogens** (Basel, Switzerland), 11(12), 1453, 2022.

DE SOUZA, G. A. P., QUEIROZ, V. F., LIMA, M. T., DE SOUSA REIS, E. V., COELHO, L. F. L., & ABRAHÃO, J. S. Virus goes viral: an educational kit for virology classes. **Virology journal**, 17(1), 13, 2020.

DORNAS, F. P., ASSIS, F. L., AHERFI, S., ARANTES, T., ABRAHÃO, J. S., COLSON, P., & LA SCOLA, B. A Brazilian Marseillevirus Is the Founding Member of a Lineage in Family Marseilleviridae. **Viruses**, 8(3), 76, 2016.

DUNIGAN, D. D., AL-SAMMAK, M., AL-AMEELI, Z., AGARKOVA, I. V., DELONG, J. P., & VAN ETTEN, J. L. Chloroviruses Lure Hosts through Long-Distance Chemical Signaling. **Journal of virology**, 93(7), e01688-18, 2019.

DUNIGAN, D. D., CERNY, R. L., BAUMAN, A. T., ROACH, J. C., LANE, L. C., AGARKOVA, I. V., WULSER, K., YANAI-BALSER, G. M., GURNON, J. R., VITEK, J. C., KRONSCHNABEL, B. J., JEANNIARD, A., BLANC, G., UPTON, C., DUNCAN, G. A., MCCLUNG, O. W., MA, F., VAN ETTEN, J. L. Paramecium bursaria chlorella virus 1 proteome reveals novel architectural and regulatory features of a giant virus. **Journal of virology**, [s. l.], 86(16), 2012.

ESMAEL, A.; AGARKOVA, I.V.; DUNIGAN, D.D.; ZHOU, Y.; VAN ETTEN, J.L. Viral DNA Accumulation Regulates Replication Efficiency of *Chlorovirus* OSy-NE5 in Two Closely Related *Chlorella variabilis* Strains. **Viruses** **2023**, *15*, 1341.

FANG, Q., ZHU, D., AGARKOVA, I., ADHIKARI, J., KLOSE, T., LIU, Y., CHEN, Z., SUN, Y., GROSS, M. L., VAN ETTEN, J. L., ZHANG, X., ROSSMANN, M. G. Near-atomic structure of a giant virus. **Nat Commun**, [s. l.], 10, 388, 2019.

FIELDS, BERNARD N.; KNIPE, DAVID M.; HOWLEY, PETER M. **Fields virology**. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2013. v. 1. ISBN 97814511056361451105630.

FISHER, R.M., BELL, T. AND WEST, S.A. Multicellular group formation in response to predators in the alga *Chlorella vulgaris*. **J. Evol. Biol.**, 29: 551-559, 2016.

FONG, S. A., DRILLING, A., MORALES, S., CORNET, M. E., WOOWORTH, B. A., FOKKENS, W. J., PSALTIS, A. J., VREUGDE, S., WORMALD, P. J. Activity of Bacteriophages in Removing Biofilms of *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Chronic Rhinosinusitis Patients. **Front. Cell. Infect. Microbiol.**, [s. l.], 7:418, 2017.

FORTERRE, PATRICK; PRANGISHVILI, DAVID. The Great Billion-year War between Ribosome- and Capsid-encoding Organisms (Cells and Viruses) as the Major Source of Evolutionary Novelty. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1178, n. 1, p. 65-77, 2009.

GENCAY, Y. E., BIRK, T., SØRENSEN, M. C. H., BRØNDSTED, L. Methods for Isolation, Purification, and Propagation of Bacteriophages of *Campylobacter jejuni*. In: Butcher, J., Stintzi, A. (eds) *Campylobacter jejuni*. **Methods in Molecular Biology**, vol 1512. Humana Press, New York, NY, 2017

GONG, C., ZHANG, W., ZHOU, X., WANG, H., SUN, G., XIAO, J., PAN, Y., YAN, S., & WANG, Y. (2016). Novel Virophages Discovered in a Freshwater Lake in China. **Frontiers in microbiology**, 7, 5, 2016.

GRABHERR, R., STRASSER, P., & VAN ETTEN, J. L. The DNA polymerase gene from *Chlorella* viruses PBCV-1 and NY-2A contains an intron with nuclear splicing sequences. **Virology**, 188(2), 721–731, 1992.

GRASSO, C. R., POKRZYWINSKI, K.L., WAECHTER, C., RYOCROFT, T., ZHANG, Y., ALIGATA, A., KRAMER, M., LAMSAL, A. A. Review of Cyanophage–Host Relationships: Highlighting Cyanophages as a Potential Cyanobacteria Control Strategy. **Toxins**, [s. l.], 14, 385, 2022.

GRAVES M.V., BERNADT C.T., CERNY R., VAN ETTEN J.L. Molecular and Genetic Evidence for a Virus-Encoded Glycosyltransferase Involved in Protein Glycosylation. **Virology**. 285, 332–345, 2001.

GUGLIELMINI, J., WOO, A. C., KRUPOVIC, M., FORTERRE, P., & GAIA, M. Diversification of giant and large eukaryotic dsDNA viruses predated the origin of modern eukaryotes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 116(39), 19585–19592, 2019.

HALLEGRAEFF, Gustaaf M.; ANDERSON, D. M.; CEMBELLA, Allan D. **Manual on Harmful Marine Microalgae**. [S. l.]: United Nations Educational, 2003. 793 p. ISBN 978-9231038716.

HARKE, M. J., STEFFEN, M. M., GOBLER, C. J., OTTEN, T. G., WILHELM, S. W., WOOD, S. A., & PAERL, H. W. (2016). A review of the global ecology, genomics, and biogeography of the toxic cyanobacterium, *Microcystis* spp. **Harmful algae**, 54, 4–20, 2016.

HARVEY, M. G., BRAVO, G. A., CLARAMUNT, S., CUERVO, A. M., DERRYBERRY, G. E., BATTILANA, J., SEEHOLZER, G. F., MCKAY, J. S., O'MEARA, B. C., FAIRCLOTH, B. C., EDWARDS, S. V., PÉREZ-EMÁN, J., MOYLE, R. G., SHELDON, F. H., ALEIXO, A., SMITH, B. T., CHESSER, R. T., SILVEIRA, L. F., CRACRAFT, J., BRUMFIELD, R. T., ... DERRYBERRY, E. P. The evolution of a tropical biodiversity hotspot. **Science** (New York, N.Y.), 370(6522), 1343–1348, 2020.

HERVÉ, LECOQ. Découverte du premier virus, le virus de la mosaïque du tabac : 1892 ou 1898 ? **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 324, n. 10, p. 929-933, 2001.

HIGASHIYAMA, T. (1967). "GIGANTISM" OF *CHLORELLA VULGARIS* I. MECHANISM OF INDUCTION OF GIGANTISM. **Plant and cell physiology**, 8(4), 581-593, 1967.

HORAS, E. L., METZGER, S. M., PLATZER, B., KELLY, J. B., BECKS, L. Context-dependent costs and benefits of endosymbiotic interactions in a ciliate–algae system. **Environmental Microbiology**, [s. l.], 1– 12, 2022.

IVANOVSKI, D. Über die Mosaikkrankheit der Tabakspflanze, St. Petersburg. **Acad. Imp. Sci. Bul**, 35, 67-70, 1982.

JACINAVICIUS, FERNANDA RIOS. ASPECTOS MORFOLÓGICOS, FISIOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS E SUAS RELAÇÕES COM PRODUÇÃO DE MICROCISTINAS EM CEPAS DE *Microcystis aeruginosa* (CYANOBACTERIA). 2015. 329 p. Tese de doutorado — Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2015.

JASKULSKA, A., MANKIEWICZ-BOCZEK, J., Cyanophages specific to cyanobacteria from the genus *Microcystis*, **Ecohydrology & Hydrobiology**, [s. l.], Volume 20, Pages 83-90, ISSN 1642-3593, 2020

JEANNIARD, A., DUNIGAN, D.D., GURNON, J.R. ET AL. Towards defining the chloroviruses: a genomic journey through a genus of large DNA viruses. **BMC Genomics** 14, 158, 2013.

JIANG, Q., ZHAO, L., DAI, J., & WU, Q. Analysis of autophagy genes in microalgae: *Chlorella* as a potential model to study mechanism of autophagy. **PloS one**, 7(7), e41826, 2012.

JUNG, J., SEO, Y. L., JEONG, S. E., BAEK, J. H., PARK, H. Y., & JEON, C. O. Linear Six-Carbon Sugar Alcohols Induce Lysis of *Microcystis aeruginosa* NIES-298 Cells. **Frontiers in microbiology**, 13, 834370, 2022.

KHAN MIRZAEI, M., & NILSSON, A. S. Isolation of phages for phage therapy: a comparison of spot tests and efficiency of plating analyses for determination of host range and efficacy. **PloS one**, 10(3), e0118557, 2015.

KOONIN EV, YUTIN N. Evolution of the Large Nucleocytoplasmic DNA Viruses of Eukaryotes and Convergent Origins of Viral Gigantism. **Adv Virus Res**, 103, 167-202, 2019.

KOONIN, E. V., DOLJA, V. V., & KRUPOVIC, M.. The logic of virus evolution. **Cell host & microbe**, 30(7), 917–929, 2022.

KOONIN, E. V., DOLJA, V. V., KRUPOVIC, M., VARSANI, A., WOLF, Y. I., YUTIN, N., ZERBINI, F. M., & KUHN, J. H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 84(2), e00061-19, 2020.

KOONIN, E. V., KRUPOVIC, M., & AGOL, V. I. The Baltimore Classification of Viruses 50 Years Later: How Does It Stand in the Light of Virus Evolution?. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, 85(3), e0005321, 2021.

KRUPOVIC, M., DOLJA, V. & KOONIN, E. The virome of the last eukaryotic common ancestor and eukaryogenesis. **Nat Microbiol** 8, 1008–1017, 2023.

KUHLISCK, C., SCHLEYER, G., SHAHAF, N., VINCENT, F., SCHATZ, D. Vardi A. Viral infection of algal blooms leaves a unique metabolic footprint on the dissolved organic matter in the ocean. **Sci Adv**, [s. l.], 18;7(25):eabf4680, 2021

LIN, W., LI, D., SUN, Z. et al. A novel freshwater cyanophage vB_MelS-Me-ZS1 infecting bloom-forming cyanobacterium *Microcystis elabens*. **Mol Biol Rep**, [s. l.], 47, 7979–7989, 2020.

LOHMAN, G. J. S., ZHANG, Y., ZHELKOVSKY, A. M., CANTOR, E. J., EVANS, T. C. Efficient DNA Ligation in DNA–RNA Hybrid Helices by *Chlorella* Virus DNA Ligase. **Nucleic Acids Res**, [s. l.], 42, 1831–1844, 2014.

LONG, A. M., & SHORT, S. M. Seasonal determinations of algal virus decay rates reveal overwintering in a temperate freshwater pond. **The ISME journal**, 10(7), 1602–1612, 2016.

LUNDELL, D. J.; GLAZER, A. N.; MELIS, A. & MALKIN, R. Characterization of a cyanobacterial photosystem I complex. **J Biol Chem**, v. 260: 646-654, 1985.

MEINTS, R. H., LEE, K., & VAN ETTEN, J. L. Assembly site of the virus PBCV-1 in a *Chlorella*-like green alga: ultrastructural studies. **Virology**, 154(1), 240–245, 1986.

MENG, L. H., KE, F., ZHANG, Q. Y., & ZHAO, Z. Biological and Genomic Characteristics of MaMV-DH01, a Novel Freshwater Myoviridae Cyanophage Strain. **Microbiology spectrum**, 11(1), e0288822, 2023.

MI S, LEE X, LI X, VELDMAN GM, FINNERTY H, RACIE L, LAVALLIE E, TANG XY, EDOUARD P, HOWES S, KEITH JC JR, MCCOY JM. Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis. **Nature**, 403(6771), 785-789, 2000.

MILROT, E., MUTSAFI, Y., FRIDMANN-SIRKIS, Y., SHIMONI, E., RECHAV, K., GURNON, J. R., VAN ETTEN, J. L., & MINSKY, A. Virus-host interactions: insights from the replication cycle of the large Paramecium bursaria chlorella virus. **Cellular microbiology**, 18(1), 3–16, 2016.

MILROT, E., SHIMONI, E., DADOSH, T., RECHAV, K., UNGER, T., VAN ETTEN, J. L., MINSKY, A. Structural studies demonstrating a bacteriophage-like replication cycle of the eukaryote-infecting Paramecium bursaria chlorella virus-1. **PLoS pathogens**, [s. l.], 13(8), e1006562, 2017.

MONIRUZZAMAN, M., WEINHEIMER, A.R., MARTINEZ-GUTIERREZ, C.A. et al. Widespread endogenization of giant viruses shapes genomes of green algae. **Nature**, 588, 141–145, 2020.

MORIMOTO, D., KIMURA, S., SAKO, Y., YOSHIDA, T. Transcriptome Analysis of a Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* during Ma-LMM01 Phage Infection. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], 9, 2, 2018.

NAKNAEN, A., SUTTINUN, O., SURACHAT, K., KHAN, E., POMWISED, R. A Novel Jumbo Phage PhiMa05 Inhibits Harmful *Microcystis* sp. **Front. Microbiol.**, [s. l.], 12:660351, 2021.

NOGUEIRA WG, GOIS BVA, PINHEIRO KDC, ARAGÃO ADO, QUEIROZ ALC, SILVA ALD, FOLADOR AC AND RAMOS RTJ. Viral Metagenomics Reveals Widely Diverse Viral Community of Freshwater Amazonian Lake. **Front. Public Health** 10:869886, 2022.

OLIVEIRA, G., SILVA, L., LEÃO, T. ET AL. Tupanvirus-infected amoebas are induced to aggregate with uninfected cells promoting viral dissemination. **Sci Rep** 9, 183, 2019.

OU, T., LI, S., LIAO, X., ZHANG, Q. Cultivation and characterization of the MaMV-DC cyanophage that infects bloom-forming cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Virologica Sinica**, [s. l.], 28(5), 266–271, 2013.

QIAN, M., LI, D., LIN, W., PAN, L., LIU, W., ZHOU, Q., CAI, R., WANG, F., ZHU, J., TONG, Y. A. Novel Freshwater Cyanophage, Mae-Yong924-1, Reveals a New Family. **Viruses**, [s. l.], 14, 283, 2022.

QUEIROZ, V. F., TATARA, J. M., BOTELHO, B. B., RODRIGUES, R. A. L., ALMEIDA, G. M. DE F. & ABRAHAO, J. S. The consequences of viral infection on protists. **Communications Biology**, 7(1), 306, 2024.

QUISPE, C. F., ESMAEL, A., SONDERMAN, O., MCQUINN, M., AGARKOVA, I., BATTAH, M., DUNCAN, G. A., DUNIGAN, D. D., SMITH, T. P. L., DE CASTRO, C., SPECIALE, I., MA, F., & VAN ETTEN, J. L. Characterization of a new chlorovirus type with permissive and non-permissive features on phylogenetically related algal strains. **Virology**, 500, 103–113, 2017.

QUISPE, C.F., SONDERMAN, O., SENG, A. et al. Three-year survey of abundance, prevalence and genetic diversity of chlorovirus populations in a small urban lake. **Arch Virol** 161, 1839–1847, 2016.

RHEINBABEN, F.V., GEBEL, J., EXNER, M., SCHMIDT, A. Environmental resistance, disinfection, and sterilization of poxviruses. In: Mercer, A.A., Schmidt, A., Weber, O. (eds) **Poxviruses**. Birkhäuser Advances in Infectious Diseases. Birkhäuser Basel, 2007.

ROBAZZA, W. S., TELEKEN, J. T., & GOMES, G. A.. Modelagem matemática do crescimento de microrganismos em alimentos. **Trends in Computational and Applied Mathematics**, 11(1), 101-110, 2010.

RODRIGUES, R. A. L., SOUZA, F. G., AZEVEDO, B. L., SILVA, L. C., ABRAHÃO, J. S. The morphogenesis of different giant viruses as additional evidence for a common origin of Nucleocytoviricota. **Current opinion in virology**, [s. l.], 49, 102–110, 2021a.

RODRIGUES, R. A. L.; ANDRADE, A. C. D. S. P.; BORATTO, P. V. M.; TRINDADE, G. S.; KROON, E.G.; ABRAHÃO, J.S. An Anthropocentric View of the Virosphere-Host Relationship. **Front Microbiol**. Aug 30;8:1673, 2017.

RODRIGUES, R. A. L.; QUEIROZ, V. F.; GHOSH, J.; DUNIGAN, D. D.; VAN ETTEN, J. L. Functional genomic analyses reveal an open pan-genome for the chloroviruses and a potential for genetic innovation in new isolates. **Journal of Virology**, [s. l.], 2022.

SAFI, CARL ET AL. Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 35, p. 265-278, jul. 2014.

SAIF, L.J., ROSEN, B.I., KANG, SY. ET AL. Cell culture propagation of rotaviruses. **Journal of Tissue Culture Methods** 11, 147–156, 1988.

SHAO, Q., AGARKOVA, I.V., NOEL, E.A. et al. Near-atomic, non-icosahedrally averaged structure of giant virus *Paramecium bursaria chlorella virus 1*. **Nat Commun** 13, 6476, 2022.

SHEN, Y., WU, Z., WANG, Y. Isolation and Identification of a Large Green Alga Virus (Chlorella Virus XW01) of Mimiviridae and Its Virophage (Chlorella Virus Virophage SW01) by Using Unicellular Green Algal Cultures. **J Virol**, [s. l.], 13;96(7):e0211421, 2022.

SLOTH, J. K.; WIEBE, M. G. & ERIKSEN, N. T. Accumulation of phycocyanin in heterotrophic and mixotrophic cultures of the acidophilic red alga *Galdieria sulphuraria*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 38: 168-175, 2006.

SPECIALE I., DUNCAN G.A., UNIONE L., AGARKOVA I.V., GAROZZO D., JIMENEZ-BARBERO J., LIN S., LOWARY T.L., MOLINARO A., NOEL E., et al. The N-Glycan Structures of the Antigenic Variants of Chlorovirus PBCV-1 Major Capsid Protein Help to Identify the Virus-Encoded Glycosyltransferases. **J. Biol. Chem.** 294, 5688–5699, 2019.

SPECIALE, I., LAUGIERI, M. E., NOEL, E., LIN, S., LOWARY, T. L., MOLINARO, A., DUNCAN, G. A., AGARKOVA, I. V., GAROZZO, D., TONETTI, M. G., VAN ETEN, J. L., DE CASTRO, C. Chlorovirus PBCV-1 protein A064R has three of the transferase activities necessary to synthesize its capsid protein N-linked glycans. **Proc Natl Acad Sci U S A**, [s. l.], 117(46):28735-28742, 2020.

SPECIALE, I., NOTARO, A., ABERGEL, C., LANZETTA, R., LOWARY, T. L., MOLINARO, A., TONETTI, M., VAN ETEN, J. L., DE CASTRO, C. The Astounding World of Glycans from Giant Viruses. **Chemical Reviews**, [S. l.], p. A-AW, 2022.

STANIER, R. Y. & COHEN-BAZIRE, G. Phototrophic prokaryotes: the cyanobacteria. **Annual review of microbiology**, v. 31: 225-274, 1977.

SU, Y., YOU, X., LIN, H., ZHUANG, H., WENG, Y., ZHANG, D. Recruitment of cyanobacteria from the sediments in the eutrophic Shanzi Reservoir. **Environmental technology**, [s. l.], 37(6), 641–651, 2016

SUN L, WANG S, QIAO Z. Chemical stabilization of the phycocyanin from cyanobacterium *Spirulina platensis*. **J Biotechnol**, v. 121: 563-569, 2006.

SUTTLE, C.A. Marine viruses--major players in the global ecosystem. **Nat Rev Microbiol.** 2007 Oct;5(10):801-12. doi: 10.1038/nrmicro1750. PMID: 17853907.

TONETTI M., ZANARDI D., GURNON J.R., FRUSCIONE F., ARMIROTTI A., DAMONTE G., STURLA L., FLORA A.D., ETEN J.L.V. Paramecium bursaria Chlorella Virus 1 Encodes Two Enzymes Involved in the Biosynthesis of GDP-L-Fucose and GDP-D-Rhamnose. **J. Biol. Chem.** 278, 21559–21565, 2003.

TUCKER, S., POLLARD, P. Identification of cyanophage Ma-LBP and infection of the cyanobacterium *Microcystis aeruginosa* from an Australian subtropical lake by the virus. **Applied and environmental microbiology**, [s. l.], 71(2), 629–635, 2005.

VAN ETEN JL, LANE LC, MEINTS RH. Viruses and viruslike particles of eukaryotic algae. **Microbiol Rev**, 55, 586–620, 1991.

VAN ETTEN, J. L., AGARKOVA, I. V., DUNIGAN, D. D., "Chloroviruses", **Viruses**, [s. l.], 12, no. 1: 20, 2020.

VAN ETTEN, J. L., DUNIGAN, D. D. Chloroviruses: not your everyday plant virus. **Trends in plant science**, [s. l.], 17(1), 1–8, 2012.

VAN ETTEN, J. L., MEINTS, R. H., KUCZMARSKI, D., BURBANK, D. E., & LEE, K. Viruses of symbiotic *Chlorella*-like algae isolated from *Paramecium bursaria* and *Hydra viridis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 79(12), 3867–3871, 1982.

VAN ETTEN, J. L.; BURBANK, D. E.; KUCZMARSKI, D.; MEINTS, R. H. Virus infection of culturable *Chlorella*-like algae and development of a plaque assay. **Science**, [s. l.], v. 219, n. 4587, p. 994–996, 1983a.

VAN ETTEN, J. L.; BURBANK, D. E.; XIA, Y.; MEINTS, R. H. Growth cycle of a virus, PBCV-1, that infects *Chlorella*-like algae. **Virology**, [s. l.], v. 126, n. 1, p. 117–125, 1983b.

VAN ETTEN, J.L.; DUNIGAN, D.D.; NAGASAKI, K.; SCHROEDER, D.C.; GRIMSLEY, N.; BRUSSAARD, C.P.D.; NISSIMOV, J.I. Phycodnaviruses (Phycodnaviridae), in: Bamford, D.H. et al. **Encyclopedia of Virology**, 4° ed. pp. 687-695, 2021. ISBN 978-0-12-814516-6.

VARANDA, C., FÉLIX, M. d. R., CAMPOS, M. D. Materatski, P. An Overview of the Application of Viruses to Biotechnology. **Viruses**, [s. l.], 13, 2073, 2021.

W. M. STANLEY. Isolation of a Crystalline Protein Possessing the Properties of Tobacco-Mosaic Virus. **Science** 81, 644-645, 1935.

WANG FEI, PAN LINGTING, QIAN MINHUA, CAI RUQIAN, LIN WEI, HONG BINXIN, ... & TONG,

WANG, F., LI D., CAI R., PAN L., ZHOU Q., LIU W., QIAN, M., TONG, Y. A Novel Freshwater Cyanophage Mae-Yong1326-1 Infecting Bloom-Forming Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Viruses**. [s. l.], 16;14(9):2051, 2022.

WATKINS, S. C., SMISTH, J. R., HAYES P. K., WATTS, J. E. M. Characterisation of Host Growth after Infection with a Broad-Range Freshwater Cyanopodophage. **PLoS ONE**, [s. l.], 9(1): e87339, 2014.

WEINBAUER, M. G. Ecology of prokaryotic viruses, **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], Volume 28, Issue 2, 2004.

WILHELM, S. W., BULLERJAHN, G. S., MCKAY R. M. L. The Complicated and Confusing Ecology of *Microcystis* Blooms. **mBio**, [s. l.], 11(3):e00529-20, 2020.

WILSON, W. H., VAN ETTEN, J. L., & ALLEN, M. J. The Phycodnaviridae: the story of how tiny giants rule the world. **Current topics in microbiology and immunology**, 328, 1–42, 2009.

XU, S., ZHOU, L., LIANG, X., ZHOU, Y., CHEN, H., YAN, S., & WANG, Y. [Novel Cell-Virus-Viropage Tripartite Infection Systems Discovered in the Freshwater Lake Dishui Lake in Shanghai, China. **Journal of virology**, 94(11), e00149-20, 2020.

YAMADA, T., ONIMATSU, H., VAN ETTEN, J. L. (2006). Chlorella viruses. **Advances in virus research**, [s. l.], 66, 293–336, 2006.

YANG, F., JIN, H., WANG, X. Q., LI, Q., ZHANG, J. T., CUI, N., JIANG, Y. L., CHEN, Y., WU, Q. F., ZHOU, C. Z., LI, W. F. Genomic Analysis of Mic1 Reveals a Novel Freshwater Long-Tailed Cyanophage. **Frontiers in microbiology**, [s. l.], 11, 484, 2020.

YIGANG. Uma nova espécie do gênero Pseudourostyla (Coleoptera, Staphylinidae) da China. (2022). Isolation and genome analysis of a new freshwater Microcystis cyanophage vB_MweS-yong2. **Acta Microbiologica Sinica**, 62(10), 3784-3800, 2022.

YOSHIDA, T.; TAKASHIMA, Y.; TOMARU, Y.; SHIRAI, Y.; TAKAO, Y.; HIROISHI, S.; NAGASAKI, K. Isolation and characterization of a cyanophage infecting the toxic cyanobacterium Microcystis aeruginosa. **Appl. Environ. Microbiol.**, [s. l.], 72, 1239–1247, 2006.

YOSHIDA-TAKASHIMA, Y., YOSHIDA, M., OGATA, H., NAGASAKI, K., HIROISHI, S., YOSHIDA, T. Cyanophage infection in the bloom-forming cyanobacteria Microcystis aeruginosa in surface freshwater. **Microbes and environments**, [s. l.], 27(4), 350–355, 2012.

ZHANG, J., ZHOU, F., LIU, Y., HUANG, F., & ZHANG, C. Effect of extracellular polymeric substances on arsenic accumulation in Chlorella pyrenoidosa. **The Science of the total environment**, 704, 135368, 2020.

ZHANG, S., HE, X., CAO, L., TONG, Y., ZHAO, B., AN, W. A Novel Wide-Range Freshwater Cyanophage MinS1 Infecting the Harmful Cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. **Viruses**, [s. l.], 14(2), 433, 2022.

ZHANG, Y., NELSON, M., NIETFELDT, J. W., BURBANK, D. E., VAN ETTEN, J. L. Characterization of Chlorella Virus PBCV-1 CViAII Restriction and Modification System. **Nucleic Acids Res.**, [s. l.], 20, 5351–5356, 1992.

ANEXOS

Atividades desenvolvidas durante o período do Mestrado

1. Participação em eventos

1.1. Participação no X Simpósio de Microbiologia da UFMG, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia;

1.2. Participação no evento II Congresso Nacional de Inovação e Popularização da Ciência - I Dia com Ciência;

1.3. Participação no 34º Congresso Brasileiro de Virologia;

1.4. Participação da Comissão Científica, avaliando trabalhos na 11º Febrat (11º Feira Brasileira dos Colégios de Aplicação e Escolas Técnicas);

1.5. Participação no GeneTime Conference 2022, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais;

1.6. Participação no “IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”, promovido pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

2. Cursos, palestras e treinamentos

2.1. Treinamento de PCR em Tempo Real (qPCR) para a plataforma QuantStudio™6 Pro, oferecido pela Thermo Fisher Scientific, no(s) dia(as) 30 de Março de 2022 com carga horária de 8 horas.

2.2. Palestra: Genome sequencing of up to 6,000-yr-old Citrullus seeds from Libya and Sudan sheds new light on the domestication of watermelon. online, ministrada por Susanne Renner no GeneTime Conference 2022,

3. Projetos de extensão

3.1. Participação no projeto de extensão “A QUÍMICA AO ALCANCE DE TODOS”, do Departamento de Produtos Farmacêuticos, da Faculdade de Farmácia da UFMG no período de 01/07/2022 a 27/10/2022.

4. Trabalhos apresentados em eventos científicos

4.1. Apresentação do trabalho EXPLORANDO A VIROSFERA: PROSPECTANDO PHYCODNAVÍRUS BRASILEIROS de autoria de Bruna Barbosa Botelho, Clécio Alonso da Costa Filho, LETHICIA RIBEIRO HENRIQUES, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Francisco Barbosa e Cristina Souza Freire Nordi, no X Simpósio de Microbiologia da UFMG;

4.2. Apresentação do trabalho É ÁGUA DO MAR! GIGANTES VERDES NO LITORAL BRASILEIRO?! de autoria de Bruna Barbosa Botelho, LETHICIA RIBEIRO HENRIQUES, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Ellen Gonçalves de Oliveira, Cristina Souza Freire Nordi e Francisco Barbosa no X Simpósio de Microbiologia da UFMG;

4.3. Apresentação do trabalho CARACTERIZAÇÃO DO CRESCIMENTO DE MICROCYSTIS AERUGINOSA PARA ISOLAMENTO VIRAL de autoria de Iandra Bruna Varela de Oliveira, Bruna Barbosa Botelho, Francisco Barbosa e Rodrigo Araújo Lima Rodrigues no X Simpósio de Microbiologia da UFMG;

4.4. Apresentação do trabalho O PANORAMA GENÔMICO E A EVOLUÇÃO DE VÍRUS GIGANTES QUE INFECTAM *Chlorella variabilis* de autoria de João Victor Rodrigues Pessoa Carvalho, Roger Carlson, Victória Fulgêncio Queiroz, Ellen Gonçalves de Oliveira, Bruna Barbosa Botelho, Clécio Alonso da Costa Filho, Irina Agarkova, James L Van Etten, David D Dunigan e Rodrigo Araújo Lima Rodrigues foi apresentado no X Simpósio de Microbiologia da UFMG;

4.5. Apresentação do trabalho “Exploring the virosphere: a path for the isolation of Brazilian phycodnaviruses”, de autoria de Botelho BB, Henriques LR, da Costa Filho CA, Barbosa FAR, Nordi CSF, Rodrigues RAL, no 34º Congresso Brasileiro de Virologia;

4.6. Apresentação do trabalho Química ao Alcance de Todos, no 25º Encontro de Extensão de autoria de: BRUNA BARBOSA BOTELHO, ANDREA HORTA MACHADO, BRENDA CRISTINA MASCARENHAS, DEBORA MARIA ABRANTES COSTA, GABRIEL VITOR DE LIMA MARQUES, PEDRO AUGUSTO LEMOS SANTANA, RENATA ADRIANA LABANCA, VINICIUS GONCALVES MALTAROLLO;

4.7. Apresentação do trabalho Comparative genomics and phylogenomics analyses of *Microcystis aeruginosa* phages, authored by Bruna Botelho and Rodrigo Rodrigues, no GeneTime Conference 2022;

4.8. Apresentação do trabalho “ANÁLISES COMPARATIVAS GENÔMICAS E FILOGENÔMICAS DE FAGOS QUE INFECTAM *Microcystis aeruginosa*” de autoria de Bruna Barbosa Botelho e Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, no “IX Simpósio de Microbiologia da UFMG – A Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã”.

5. Co-orientação

5.1. Co-orientação no Trabalho de conclusão de curso de Ciências Biológicas – Bacharelado, Centro universitário UNA. Desenvolvido pelos alunos Bianca Gonçalves Rodrigues; Bruno de Oliveira Venâncio Alves de Souza; Carla de Castro Silva, Iandra Bruno Varela De Oliveira.

6. Créditos cursados

6.1. Foram cursados 36 créditos, dos quais 30 foram utilizados para integralização.

7. Produção científica

7.1. “*Giant Viruses as a Source of Novel Enzymes for Biotechnological Application*”, de autoria de Ellen Gonçalves de Oliveira, João Victor Rodrigues Pessoa Carvalho, Bruna Barbosa Botelho, Clécio Alonso da Costa Filho, Lethícia Ribeiro Henriques, Bruna Luiza de Azevedo e Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, publicado em 2022 na revista *Pathogens*.

7.2. “*The consequences of viral infection on protists*” de autoria de Victoria Fulgencio Queiroz, Juliana Miranda Tatara, Bruna Barbosa Botelho, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues, Gabriel Magno de Freitas Almeida e Jônatas Santos Abrahão, publicado em 2024 na revista *Communications Biology*.

7.3. “*Genomics and evolutionary analysis of *Chlorella variabilis*-infecting viruses pave the way for defining species of giant viruses*” de autoria de João Victor Carvalho, Roger Carlson, Jayadri Ghosh, Victória Queiroz, Ellen Oliveira, Bruna Botelho,

Clécio Filho, Irina Agarkova, James Van Etten, David Dunigan e Rodrigo Rodrigues.
Artigo em fase de revisão, 2024.

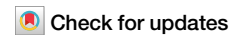
8. **Organização de eventos**

8.1. Organização do X Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2023;

8.2. Organização do IX Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2022 – A
Microbiologia no Brasil: A ciência de hoje para soluções dos problemas do amanhã.

<https://doi.org/10.1038/s42003-024-06001-2>

The consequences of viral infection on protists



Victoria Fulgencio Queiroz¹, Juliana Miranda Tatará², Bruna Barbosa Botelho¹,
Rodrigo Araújo Lima Rodrigues¹, Gabriel Magno de Freitas Almeida^{1,2,3}✉ &
Jonatas Santos Abrahao^{1,3}

Protists encompass a vast widely distributed group of organisms, surpassing the diversity observed in metazoans. Their diverse ecological niches and life forms are intriguing characteristics that render them valuable subjects for in-depth cell biology studies. Throughout history, viruses have played a pivotal role in elucidating complex cellular processes, particularly in the context of cellular responses to viral infections. In this comprehensive review, we provide an overview of the cellular alterations that are triggered in specific hosts following different viral infections and explore intricate biological interactions observed in experimental conditions using different host-pathogen groups.

The taxon “Protozoa” was formalized by the English biologist, comparative anatomist, and paleontologist Richard Owen in 1858¹. At the time, the taxon comprised “*numerous organisms of minute size retaining the form of nucleated cells, which manifest the common organic characters, but without the distinctive superadditions of true plants or animals*”¹. Since then, the terms protozoa, protozoans, protista and protists have been used to designate a variety of eukaryotic groups^{2,3}. As this taxon does not encompass well established clades that diverged from it, protists form a paraphyletic group. Similar to other paraphyletic taxa, it proves challenging to identify universal characteristics among all its members². Nevertheless, protists can be defined as predominantly unicellular eukaryotic organisms, which do not develop their tissues through the process of embryonic stratification^{4,5}. Their cell morphology showcases an astonishing diversity of forms, functions, and survival strategies. They are widespread worldwide, and comprise marine, freshwater, terrestrial, symbiotic, and pathogenic strains^{2,6,7}. However, taxonomists estimate that the known representatives compose only a small portion of the total of protists on Earth today, and that the diversity of this group is greater than that of metazoans^{6,7}.

With such abundance and richness, these eukaryotes are part of communities with a wide diversity of organisms and are especially studied for their interactions with pathogens or regarding their own pathogenicity⁷. A frequent example in literature are amoebae. Most amoebae are free-living protists of great diversity that have garnered significant attention due to their intricate associations with a plethora of microorganisms from all domains of life^{8–19}. Free-living amoebae occupy different ecological niches and have already been found in a wide range of natural and anthropized environments⁷. The most notorious feature

of amoebae is their ability to alter their cell shape by creating temporary extensions of cytoplasm known as pseudopods, which serves both for feeding and movement⁷. Due to their foraging behaviors and predatory nature, amoebae are often considered as professional phagocytes, mainly consuming microorganisms to fulfill their nutritional needs⁹. However, many microorganisms successfully evade the phagocytic pathway and thrive within the amoebae, turning them into transmission vehicles or incubators and enabling various types of ecological relationships to occur, from symbiotic to parasitic⁹. Besides, their cell biology and active grazing behavior serve as a widely used infection route for giant viruses, although miscellaneous entry mechanisms have already been described for this phylum of viruses^{10,20,21}. Given the substantial size of their viral particles, they can trigger phagocytosis in amoebae, creating entry opportunities^{11–14}. In fact, the efficiency of this route lead other giant viruses that lack the requisite size for phagocytosis to employ a mimicry strategy to use the phagocytic pathway as an entry route¹⁵.

The myriad of interactions involving amoebae renders them exceptional experimental models to explore and investigate a diversity of scientific fields¹⁶. Over the years, amoebae have contributed to the understanding of a wide array of subjects. These encompass the unraveling of mechanisms related to the resistance and pathogenicity of microorganisms, the intricacies of cell locomotion, the functioning of non-muscle contractile systems, the dynamics of populations and communities, the implications of cell nucleus removal and transplantation, events involving horizontal gene transfer, and the evolution of organelles, that may provide valuable insights into the origin and evolution of eukaryotic cells^{9,22–29}. This shows that the study of protists can help advance different fields of science. However, to

¹Federal University of Minas Gerais, Institute of Biological Sciences, Department of Microbiology, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. ²The Norwegian College of Fishery Science, Faculty of Biosciences, Fisheries and Economics, UiT - The Arctic University of Norway, Tromsø, Norway. ³These authors contributed equally: Gabriel Magno de Freitas Almeida, Jonatas Santos Abrahao. ✉e-mail: gabriel.d.almeida@uit.no

transcription factors^{30,31,33,34}. Additionally, these studies have contributed significantly to our comprehension of biochemistry, elucidating tyrosine kinases and signal transduction pathways^{30,31,33}. Furthermore, they have shed light on immunology and many other intrinsic aspects of host cells. These include our understanding of histocompatibility antigen function, interferons, cellular oncogenes, tumor suppressor proteins, and apoptosis in eukaryotic hosts^{30,31,33,35}. They've also contributed to our knowledge of the CRISPR/Cas9 mechanism in bacterial and archaeal hosts, which is now widely used for genome editing for many biotechnological purposes³⁶.

Undoubtedly, the field of virology has made substantial contributions to science, extending beyond its significance in diseases. Throughout history, the discovery of viruses has primarily been driven by the concerns of human health, and the health of other animals and plants of economic importance^{30,33,37}. This implies that most of the described viruses have direct connections to humans, whether in the realms of economics, medicine, or biotechnology, resulting in an extremely anthropocentric known virosphere³⁷. However, the viruses known to humankind represent only a small fraction of the viral diversity on Earth. As viruses infect organisms of the three domains of life, and some studies estimate the count of viral particles on Earth to be of the order of 10^{31} , there remains a large number of undiscovered viruses^{35,38}. Still, due to the absence of a universal molecular marker for viruses, the true extent of global viral diversity remains largely unknown.

Despite having a small number of identified representatives so far, viruses that infect protists exhibit a remarkable diversity (Fig. 1). One of the earliest mentions of virus-like particles (VLP) in protozoa seems to have been documented in 1960 within *Entamoeba histolytica*³⁹. Over the years, many taxa of viruses that infect protists have been identified, with representatives containing DNA or RNA genomes of various topologies and sizes, which can exist either in a naked form or be enclosed within capsids, that also exhibit diverse sizes and symmetries^{40–47}. Among these viruses, a group that garners significant attention due to the complexity of their genomes and the size of their particles are the viruses of the phylum *Nucleocytoviricota*. Regardless of their hypothetical monophyletic origin, the viruses belonging to this phylum display a broad host range within eukaryotes. This group includes the giant viruses (GVs) that infect amoebae, the ones holding the distinction of possessing the largest genomes and viral particles found in the virosphere⁴⁸. Although these viruses infect amoebae in the laboratory, their natural hosts are still uncertain. Over the past two decades, there has been dedicated research into the exceptional biological traits of these viruses, the enigmatic composition of their genomes and particles, and their ecological significance.

Virology is an integrative science. Host-parasite interactions can reveal valuable information about cellular alterations and host defense mechanisms that can be used to study basic cellular processes^{30,33}. During a viral infection, the virion and host experience modifications of such magnitude that both start to present a different nature, sometimes even shifting the cellular role to solely producing the viral progeny. In consideration of this, the term 'virocell' was coined to refer to this specific moment when a virus is actively infecting a cell⁴⁹. One of the most characteristic changes during a viral infection is the establishment of a viral factory (VF), that can be formed in both the cytoplasm or nucleus of the cell. It is the place where viral progeny is assembled, and often, the genetic material is replicated. Its formation is usually accompanied by extensive cytoplasmic rearrangements⁵⁰. Therefore, studying host-pathogen interactions can uncover how protists respond to viral infections and highlight the features that were evolutionarily selected to counter viral threats. Moreover, viruses can be engineered for various biotechnological purposes, including gene delivery and genome editing. This technology can help elucidate protist biology for basic research or practical purposes⁵¹. Besides, these studies can also provide enlightenment into general cell biology that may apply to a wider range of eukaryotic organisms. In this review, we provide an overview of the effects of virus infection and replication on protists and discuss some prospects that the investigation into viral infections in protists could offer.

Cell machinery and morphology modulation in protist cells during viral infections

Over the past two decades, studies concerning giant viruses have highlighted virus-protist interactions⁵². Amoeba, particularly the genus *Acanthamoeba* and the species *Vermamoeba vermiformis*, are commonly studied hosts that suffer cell machinery and morphological changes after infection⁵³. The ciliate *Tetrahymena* sp. also shows alterations following GV inoculation. Limited details exist for protists infected with GV and other viruses, including diatoms, flagellates, dinoflagellates and algae. A list of publications mentioning cellular alterations derived from viral infections in protists is shown in the supplementary data file (tab 2). Below, we discuss these alterations in detail for each main host group.

Acanthamoeba castellanii and their broad response to different viruses

Most known GV groups were isolated in *A. castellanii*⁵⁴. A successful giant virus infection triggers the formation of VFs inside the host cells. However, some studies mention cytopathic effects (CPEs) without evident VFs^{55–57}. Nevertheless, GV's DNA replication may also happen in the nucleus, with assembly in cytoplasm⁵⁸. Noumeavirus, for instance, recruits the host's nuclear transcription machinery to the cytoplasmic VF⁵⁹. An overview of some of the main changes using the *A. castellanii* model as an example can be seen in Fig. 2.

Some GV's infections can disorganize and deform the nucleus of *A. castellanii*, leading to loss of its spherical appearance, membrane invaginations, or degradation^{55,60–66}. The cytoplasm may undergo significant changes including acidification, organelle rearrangement, cytoskeleton modulation with fragmentation and shortening of microtubules, lower quantity of vacuoles, viral particles present inside vacuoles, formation of Golgi apparatus-like vesicles, among others^{59,61,63,64,67–72} (Fig. 2a).

Viral infection can also modulate the energy of the host, redirecting it to the replication site, often involving the recruitment of mitochondria to VFs^{60,65,73,74}. Mollivirus sibericum infection results in smaller and elongated mitochondria, although host cells did not present changes in cellular adhesion and morphology⁶². Despite that, cell rounding is one common CPE, observed after GV's infection (Fig. 2b)^{75–78}. Studies also reported loss of cell adhesion decreased motility, and intercellular bridges or rotational behavior^{55,56,76,79,80}. A peculiar CPE is cellular aggregation ("bunches")^{77,81,82}. This mechanism was suggested to increase viral dissemination during Tupanvirus infection, as mannose-binding protein gene transcripts are significantly increased at earlier times of infection (1, 2 and 4 h post-infection [HPI]) and precedes the formation of bunches (6 HPI) between infected and uninfected cells.

A. polyphaga and *V. vermiformis* morphology modifications upon giant viruses' infection

Fewer studies described CPE in *A. polyphaga* during GV's infection. *Acanthamoeba polyphaga* mimivirus (APMV) infection leads to nucleus enlargement, prominent VF formation in the cytoplasm, multivesicular bodies and endoplasmic reticulum (ER) membranes appearance around VF, stimulus of ER synthesis, significant structural alteration in microtubules and actin microfilaments resulting in cells becoming smooth, rounded, and losing motility^{83–85}. Marseillevirus infection induces similar VFs to the observed in *A. castellanii*, with lack of a clear boundary with cytoplasm^{67,86}. Furthermore, cell rounding with formation of cell chains was reported for the first time after a viral infection in amoeba⁸⁷.

Over the past decade, studies implemented *V. vermiformis* as a new isolation platform, leading to the discovery of new GV's^{12,13,88–94}. Their infection resulted in cell rounding and loss of adhesion^{88,94}, and cell stretching with increased motility before cell rounding¹². The formation of "blebs" and cell bunches seen in *V. vermiformis*, were previously reported in *A. castellanii*^{12,73,91}. A distinct response was the encystment of neighbor non-infected cells after the exposure to infected cell-released non-proteic soluble factors, serving as a defense mechanism, as those cysts become unviable

Table 1 | Overview of the proteomic and transcriptomic studies of different protist organisms infected by their respective viruses

References	Protist organism	Virus	Technique	Time post infection	FoldChange	Down	Up
Rodrigues et al. (2020) ¹³⁷	<i>A. castellanii</i>	Marseillevirus	RNAseq	0, 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, and 12HPI	<-1 and >1	28	19
Legendre et al. (2015) ⁶²	<i>A. castellanii</i>	Mollivirus sibericum	LC-MS/MS	0 to 6HPI	<-2 and >2	38	30
Zhang et al. (2021) ¹³⁸	<i>A. castellanii</i>	Medusavirus	RNAseq	8 to 16HPI	<-0.445 and >0.364	7970	2657
Moniruzzaman et al. (2018) ¹⁶⁰	<i>A. anophagefferens</i>	Aureococcus anophagefferens virus	RNAseq	5 min	<-1.5 and >1.5	588	412
				30 min		≈ 865	≈ 505
				1HPI		82	0
				6HPI		≈ 1060	≈ 690
				12HPI		≈ 1260	≈ 1260
				21HPI		≈ 1430	≈ 1620
Poimala et al. (2022) ¹³⁸	<i>Phytophthora cactorum</i>	PcBV1 & 2	RNAseq	- ^a	<-2 and >2	23	10
			Nanoflow reverse-phase LC-MS	- ^a	<-1.19 and >1.37	17	36
Provenzano et al. (1997) ¹⁷¹	<i>T. vaginalis</i>	TVV	2D	-	-	41	47
He et al. (2017) ¹⁷⁴	<i>T. vaginalis</i>	TVV	iTRAQ labeling	-	<-1 and >1	21	29
Rada et al. (2022) ¹⁷⁵	<i>T. vaginalis</i> (exosome vesicle)	TVV	LFQ-MS	-	<-2 and >2	55	20

"FoldChange" means threshold utilized by each study to determine when a protein or transcript presents increased expression (upregulated - "up") or decreased expression (downregulated - "down"). Other protists are not included on this table since information on the number of deregulated proteins or transcripts was not the focus of the publication or this data was not provided.

^aThe virus was removed from the protist strain, thus there was no time post-infection.

trapping the virus inside⁹⁰. Nuclear alterations of infected *V. vermiformis* include loss of the rounded shape, decrease in surface area, or nucleus disappearance^{12,13,90-94}. Furthermore, clandestinivirus formed its VF within the nucleus⁸⁸. *V. vermiformis*' mitochondrias were also reported to be recruited around VFs^{12,13,90,91,93,94}. Investigating the unique cellular responses in amoebae to various GVs is essential for establishing correlations in host-virus interaction and comparing potential CPEs to other types of host cells.

Other protists' morphology and behavior in response to virus inoculation

When exploring protist susceptibility to Tupanvirus beyond amoebae, it was found that the ciliate *Tetrahymena* sp. experience cytotoxic effects in response to the viral presence. The morphological changes included gradual vacuolization, nuclear degradation, loss of motility, and formation of vesicles, similarly to the observed in *A. castellanii*. However, the ciliate does not support viral replication⁶¹.

In contrast to the extensive use of amoeba to study viral infections, there are relatively fewer reports focusing on interactions between viruses and other protists. Among algae protists, the viral infection of *Aureococcus anophagefferens*, a component of ocean blooms, can trigger nucleus and organelle degradation (such as chloroplast) in some infected cells, cell lysis, and loss of the outer polysaccharide glycocalyx during viral infection, even in environmental samples⁹⁵⁻⁹⁹. In addition, viral infection of another bloom-forming protist, *Heterosigma akashiwo*, pointed to nucleus degradation and damaged cell wall¹⁰⁰. When infected by HaNIV virus, cell nucleus presented margination of heterochromatin, but no morphological changes¹⁰¹. Conversely, the infection by HaV01 and HaV triggered cell rounding, and loss of cell motility, together with chloroplast degradation for HaV infection^{102,103}. Interestingly, chloroplasts have been reported to remain intact until cell lysis¹⁰⁴. Vacuolation, disintegrated cytoplasm and ER swelling were reported during HaRNAV infection in *H. akashiwo*¹⁰⁵. Furthermore, in the haptophyte algae *Chrysochromulina parva* and *Prymnesium parvum* the infection by their respective viruses resulted in absence or degradation of cell nucleus^{106,107}.

In the diatoms *Chaetoceros* sp, *Guinardia delicatula* and *Rhizosolenia setigera* the infection by their respective viruses resulted in common CPEs: degradation of chloroplasts and/or photosynthetic pigments^{98,108-113}. Few *Chaetoceros* species additionally exhibited cytoplasm degradation^{108-111,114}, and nucleus or nucleolus degradation was reported in *Chaetoceros salsugineum* and *Guinardia delicatula*^{98,115}. Similarly, chloroplast shrinkage and chlorophyll degradation were suggested during the infection of the phytoplankton coccolithophore *E. huxleyi* by its lytic virus^{116,117}. Nucleus degradation was identified in infected *E. huxleyi* cells, as well as cellular aggregation, likely as a defense strategy to sink infected aggregated cells¹¹⁶⁻¹¹⁸. Furthermore, mitochondrial damage with vacuolar acidification was described during the infection by EhV99B1¹¹⁹.

Regarding flagellates, the protist *Giardia* sp. has two life cycle stages, a trophozoite and a cyst form^{120,121}. Only its trophozoite stage is susceptible to viral infection, and few morphological changes have been reported for *Giardia canis* and *Giardia lamblia* infected by GCV and GLV, respectively. During GCV infection, the protists presented vacuolization, enlargement of ER, and its cytoplasm became very loose, and during GLV only cell adherence was impaired upon infection^{122,123}. Although, no cell death was reported for both studies, corroborating to the suggestion that giardiaviruses are released from the cell without triggering cell lysis¹²¹. *G. duodenalis*, however, experiences reduction in cell growth without apparent morphological changes¹²⁴. In the free-living flagellate *Bodo saltans* infected by the virus BsV, morphological changes included degraded nucleus and intracellular structures, with lipid vesicles migrating through the VF, while kinetoplast remained intact for longer⁹⁶.

The bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*, associated with red tides and bivalve mortality, can be infected by RNA and DNA viruses. During the DNA virus infection, a VF is formed with granular or fibrous material inside, in addition to organelles disruption¹²⁵⁻¹²⁷. However, the RNA virus infection triggered organelles, nuclear and chlorophyll-a degradation, and loss of cellular motility¹²⁸⁻¹³⁰. Interestingly, some of the cells were resistant to the RNA virus infection, but not the DNA one, and the non-resistant cells underwent cell lysis^{129,131}. Furthermore, the dsDNA virus

infection triggered damage to *Symbiodinium* cell nucleus initially, and later to organelles¹³². The dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi* shows nuclear degradation and swollen chloroplasts upon viral infection¹³³. Nuclear degradation is also reported to the nonphotosynthetic stramenopile from the genus *Sicyodochytrium* upon viral infection¹³⁴. Overall, relating viral responses across different protist organisms and viruses remains challenging, due to the limited number of studies in this field and the scarcity of available isolates for research.

Metabolic changes in protist cells during virus infection

To investigate cell-virus interactions at the molecular level, different approaches, including transcriptomics and proteomics, have been employed, revealing that each virus modulates their host in a unique manner^{135,136}.

Changes in *Acanthamoeba* sp

Proteomic analysis of *A. castellanii* infected by Mollivirus sibericum identified a few upregulated proteins related to histones, autophagy, DNA synthesis and packaging; and a few downregulated proteins with no clear functional relationship⁶². Together with the fact that this virus is released through exocytosis rather than cell lysis, an overall cellular integrity is suggested throughout the replication cycle⁶². Likewise, few genes were deregulated at the transcriptional level during Marseillevirus infection¹³⁷. Transcripts expression across early, intermediate, and late time periods showed only 48 genes deregulated among these periods (Table 1), with the upregulation of proteins mainly linked to exosome secretion, transfer RNA biogenesis and genetic information processing; and the downregulation of proteins linked to translation apparatus (rRNA related proteins), tRNA encoding genes, carbohydrate metabolism and lipid biosynthesis¹³⁷. For Marseillevirus, amoebal and mitochondrial transcript levels decreased after 1 h post-infection (HPI)¹³⁷.

Contrastingly, Medusavirus infection in *A. castellanii* resulted in thousands of differentially expressed host genes, although mitochondrial gene modulation resembled the pattern of Marseillevirus infection. Only 25% of nuclear host genes, mainly related to ribosome and proteasome pathways, increased its expression between 8 to 16 HPI, suggesting the host to be suffering protein degradation, along with increased viral protein synthesis. The remaining 75% experienced decreased expression during that same period. Gene ontology suggested a reduction in transport activity, although at 48HPI many of these genes were downregulated, in addition to an upregulation of encystment-mediated genes¹³⁸.

Furthermore, Tupanvirus inoculation triggered rRNA shutdown only by the presence of viral particles, unrelated to viral replication⁶¹. Genomic analysis of tupanviruses revealed the involvement of the ribonuclease T2, an enzyme related to the reduction of the physiological activity and phagocytosis capacity in protist hosts¹³⁹.

Bloom-forming and dinoflagellate protists

Infected by lytic and non-lytic viruses, the coccolithophore *E. huxleyi*, is ecologically crucial for marine carbon flux^{140,141}. The correlation between transcriptomics and metabolomics analysis during viral infection indicated that early during infection (1–4 HPI), there was an upregulation of sphingolipid biosynthesis and glycolysis shuffling energy to fatty acids biosynthesis. Later (24HPI), a shift to the activation of the pentose phosphate pathway to produce nucleotides occurred, while glycolysis and fatty acids became downregulated¹¹⁷. Similar results were found for genes related to sphingolipid metabolism, such as the upregulation of dihydroceramide desaturase (DCD) at 6HPI and its downregulation at 45HPI¹⁴². *E. huxleyi* DCD transcript, together with serine palmitoyl transferase (SPT) transcript (another enzyme from sphingolipid biosynthesis pathway) level results pointed to the same tendency of a decrease in these host transcripts production in the environment¹⁴³. Other studies also found lipid modulation in *E. huxleyi* during viral infection, including fatty acids and highly saturated triacylglycerols, and lipid metabolism was suggested to be regulated by modulation of the PI3K-Akt-TOR signaling pathway^{144–152}.

Furthermore, a single cell transcriptomics analysis of *E. huxleyi* during infection revealed an early shutdown of nuclear transcripts, with mitochondrial and chloroplast transcripts initially higher but gradually declined¹⁵³. Indeed, there was a decrease in genes involved in photosynthesis at 6, 12 and 24 HPI, although some cells seemed to be intact and photosynthesizing¹⁴⁸. Enriched functions associated with *E. huxleyi* responding to viral infection included modified amino acid, lipid binding, porin activity, calcium channel activity, pore complex, cell outer membrane, bacterial-type flagellum functions, among others¹⁵⁴. High expression of glycolysis and nucleotides biosynthesis related genes were reported when studying single protist cells from a coccolithophore bloom¹⁵¹. In addition, there was an upregulation of autophagy related genes, with decreased expression of negative regulatory factors, such as PI3K, and an increase of reactive oxygen species (ROS), which is all related to the programmed cell death (PCD) triggered in *E. huxleyi* after infection¹¹⁹. In fact, 20 ROS scavenging genes were impacted after viral infection, and ROS-related genes were found to be increased through transcriptomic analysis^{155,156}. Cell death induced by viral presence could occur before viral particles release, which can be associated with cell autophagy as a defense strategy to avoid viral dissemination, although autophagy is also essential for viral propagation^{117,157}. *E. huxleyi* cell cycle can be affected by virus infection through the modulation of cyclin expression, and host life cycle genes have been found to be impacted during viral takeover of the protist in environment^{149,158,159}. Altogether, these findings suggest substantial cellular changes in *E. huxleyi* after viral encounter, influencing factors related to cell death, modulation of energy, and specific lipids production, alongside a decline in nuclear activity, potentially playing a role in the modulation of oceans blooms¹⁵³.

Another bloom forming protist, *Aureococcus anophagefferens*, exhibited transcripts downregulated at six different time points during viral infection. A massive deregulation started as early as 5 min post-infection and continued after 6HPI. Downregulated proteins indicated the suppression of pathways related to host cytoskeleton formation, photosynthesis, fatty acid metabolism, and carbohydrate biosynthesis. The upregulated group of proteins indicated the activation of host cellular respiration, transcription, protein synthesis, polyamine biosynthesis, and RNA processing. Transcripts related to host defense mechanism were likely suppressed. This dramatic cell modulation indicates the virus–host interaction in a time dependent manner until cell lysis occurs, correlating with the virus's role in brown tide blooms¹⁶⁰.

For *Phaeocystis globosa*, viral infection prevented the accumulation of polyunsaturated fatty acids, decreased protist photosynthetic performance and upregulated mitochondrial respiration, triggered the fragmentation of DNA and activation of caspases, and prevented *P. globosa* to release star-like structures, which in turn affects host carbon assimilation^{161–164}. The correlation among such changes is speculative, suggesting an association with the lysis mechanism triggered in this organism post-viral infection.

Comparing the transcriptomic responses of the dinoflagellates *Symbiodinium tridacnidorum* and *Symbiodinium* C3 under or not UV light exposure (with and without viral replication, respectively), both exhibited upregulated viral transcription and related terms, but only *S. tridacnidorum* triggered downregulation of transcripts related to host-response to viral infection¹⁶⁵.

Protists responsible for causing human or plant disease

After the discovery of *Trichomonas vaginalis* virus (TVV), few studies investigated *Trichomonas vaginalis* cell responses to infection^{166,167}. Initial findings described that most clinical isolates had the presence of a dsRNA icosahedral virus, and that the expression of a major immunogen (P270) on cell surface, and the expression of Ig-degrading proteinases, were directly correlated with its presence^{168–170}. An overview of the protein expression pattern of *T. vaginalis* after TVV infection found at least 47 expressed and 41 suppressed proteins linked to the virus¹⁷¹. Isolates of *T. vaginalis* might be infected by up to 4 different strains of TVV, and only the cells infected by TVV2 and TVV3 are capable of inducing P270 protein expression^{172,173}.

Proteomic studies comparing infected and uninfected cells detected the upregulation of adhesin proteins related to the pathogenicity of *T. vaginalis* when infecting humans¹⁷⁴. Further, metabolic enzymes, ribosomal and heat shock proteins were also differentially impacted¹⁷⁵. Extracellular vesicles of *T. vaginalis* infected by TVV exhibit differences in protein content, such as a protein responsible for increasing adherence, suggesting enhanced exosome binding and pathogenicity¹⁷⁵. Overall, TVV plays an important role in *T. vaginalis* dynamics by modulating different genes that aid the protist to successfully establish in its host.

After the discovery of endosymbiotic viruses in *Leishmania*'s cytoplasm, most studies focused on the relation *Leishmania*'s pathogenicity to humans when infected or not by one of its two viruses, LRV and LBV^{176–178}. The metastasizing *L. Viannia* had a higher amount of LRV1, suggesting that the virus triggers parasitic resistance¹⁷⁹. A study looked for transcriptional changes in *L. guyanensis* and *L. major* when removing their respective viruses LRV1 and LRV2¹⁸⁰. As a result, *L. guyanensis* did not suffer significant changes, with only 2 differentially expressed genes. On the other hand, proliferation rate of *L. major* cells decreased, with 67 upregulated and 20 downregulated transcripts after its virus removal. Among the downregulated group, there was a cyclin related to growth kinetics; and the membrane-bound acid phosphatase 2 enzyme, which has been already suggested to affect the biology of *Leishmania*. The upregulated group presented transcripts related to autophagy, cell response to various stimuli, and nucleosome assembly¹⁸⁰.

Oomycetes from the genus *Phytophthora* are responsible for causing great damage to agriculture¹⁸¹. A metagenomic study of *Phytophthora condilina* resulted in 15 different putative viruses identified¹⁸². Moreover, GVs sequences have been identified in the genome of *Phytophthora parasitica*¹⁸³. Phytophthora endornavirus 2 (PEV2) and Phytophthora endornavirus 3 (PEV3), are suggested to stimulate zoosporangium development and inhibit hyphal growth, also reducing the host oomycete sensitivity to the antifungal metalaxyl¹⁸⁴. In addition, seven different viruses were able to replicate in *P. infestans*, and viral infection apparently did not affect the cell host morphology but stimulated the growth of the mycelium mass¹⁸⁵. Notably, the infection of *P. infestans* by PiRV-2 is suggested to increase the protist sporulation, which in turn is associated with a likely hypervirulent factor against its plant host¹⁸⁶. However, sporulation of *P. cactorum* infected by PcBV1 & 2, seemed deeply affected when compared to *P. cactorum* with PcBV1 & 2 ablation. Its sporangia production and size decreased during viral infection, together with reduced hyphal growth¹⁸⁷. This same research used *P. cactorum* as a model to explore the transcriptomic and proteomic changes after removing PcBV1 & 2 from the protist, and identified 10 up- and 23 downregulated transcripts, as well as 36 up- and 17 downregulated proteins¹⁸⁷. The excreted protein elicitor was found upregulated in the infected cells¹⁸⁷. This protein is related to the suppression of the plant immune response but can also be recognized by the plant and become a factor that reduces protist pathogenicity^{188,189}. Overall, *Phytophthora* can be pathogenic or not to its plant host depending on many factors, including the infecting virus type.

Cellular resistance strategies after stress exposure

All living organisms are subjected to the exposure of extrinsic factors that can trigger a stress response at the cellular level. Stress refers to any environmental condition that can be harmful to cells and induce physiological changes that disturb homeostasis¹⁹⁰. Biotic stress is caused by interaction with other living beings that will act as stressors, particularly parasitic relationships involving viruses, bacteria, and fungi. Abiotic stress arises from physicochemical factors that can affect cell physiology, such as pH, temperature, radiation, osmolarity and chemical molecules^{190,191}. Despite its disruption of homeostasis, environmental stress is an important factor when it comes to evolution. Cells capable of restoring homeostasis after stress, called acclimatized cells, are favored through natural selection¹⁹⁰. Protist cells employ various responses to stressors programmed cell death (PCD). One example is the response of *Peridinium gatunense* to oxidative stress. At the end of the algal blooms caused by this dinoflagellate, CO₂ becomes

significantly limited, leading to the production of reactive oxygen species which trigger PCD¹⁹². *Aureococcus anophagefferens*, responds to stress conditions such as low concentrations of inorganic nitrogen and inorganic phosphorus through a transcriptional shift: transcripts related to nitrogen transport and metabolism, and transcripts encoding enzymes that hydrolyze organic phosphorus or alleviate arsenic toxicity are upregulated in these scenarios. In addition, in the context of low light levels, which acts as a stress factor, transcripts encoding enzymes that catabolize organic compounds, restructure lipid membranes, or are involved in the biosynthesis of sulfolipids are upregulated to restructure lipids and renovate the photosynthetic apparatus. The cell undergoes several physiological changes to maintain the survival and ecological success of the species¹⁹³.

Spore formation as a response to infection

The marine diatom *Chaetoceros socialis* responds to stress caused by adverse conditions of temperature, light and lack of nutrients through spore formation. Viruses are widely distributed and persistent biological stressors, and some of them are also capable of inducing spore formation¹⁹⁴. For instance, CsfRNAV01 can effectively induce significant spore formation in *C. socialis*. Viral infection acts as a biotic trigger that induces a substantial formation of heavily silicified spores. Interestingly, their spores do not produce infectious viral particles, making this shift in the life cycle an effective defense strategy against viruses and preventing the loss of a portion of the protist population¹⁹⁴.

Emiliania huxleyi life cycle shift as a defense strategy

Another protist that relies on a life cycle shift is *E. huxleyi*, a photosynthetic organism widely distributed throughout the oceans. It has two independent phases, haploid and diploid, each with distinct morphologies¹⁹⁵. The haploid form (N) consists of biflagellated cells covered by thin, organic, non-mineralized scales. In contrast, the diploid (2N) is nonmotile and contains minute calcite platelets, named coccoliths¹⁹⁶. The latter is responsible for large natural algal blooms, an important environmental problem¹⁹⁷. It is known that calcium plays an important role during the viral entry process into the host cell in different infection models^{198–201}. One significant difference between the N and 2N phases of *E. huxleyi* is the calcium metabolism being considerably greater in the diploid phase than in the haploid phase, affecting virus-host interactions¹⁹⁷. Haploid cells are resistant to infection and subsequent lysis by *Emiliania huxleyi* virus, whereas this infection contributes to the decline of diploid populations during algal blooms¹⁹⁷. Evidence suggests that those lytic viruses are responsible for demising the algae population and terminating algae blooms. Thus, *Emiliania huxleyi* viruses are responsible for regulating the population of this coccolithophore both in abundance of cells in the environment and in composition^{195,197,202,203}. Such protist-virus interaction can directly activate the life cycle transition, since the oxidative stress caused by viral infection can trigger the diploid-to-haploid shift¹⁹⁷. Viral infections are known to increase the production of reactive oxygen species in 2N cells, which induces the activation of metacaspases and, thus PCD is triggered²⁰⁴. However, oxidative stress response leads not only to cell death but also to induction of the aforementioned shift¹⁹⁶. Although studies conducted using 1N *E. huxleyi* strains found viral RNA and small amounts of EhV glycosphingolipids within the cells^{146,205}, a later study using the host resistant strains have not found any EhV genetic material, which suggests that there is no resistant strain bearing any form of the virus¹⁹⁵. Haploid virus-resistant cells are produced as a response to viral infection¹⁹⁵. This is referred to as the 'Cheshire Cat' strategy, in which the organism escapes the parasite by shifting to a life stage that is infection-resistant¹⁹⁷.

Encystment as amoebae' resistance form against viral infections

The 'Cheshire Cat' theory extends to describe a relationship between a giant virus and an amoeba as well. Some amoebae hosts are also capable of shifting to an infection-resistant life form²⁰⁶. Amoebae have two life cycle stages, trophozoites and cysts. The trophozoite stage is the one that predominates when environmental conditions are favorable, such as nutrient supply and

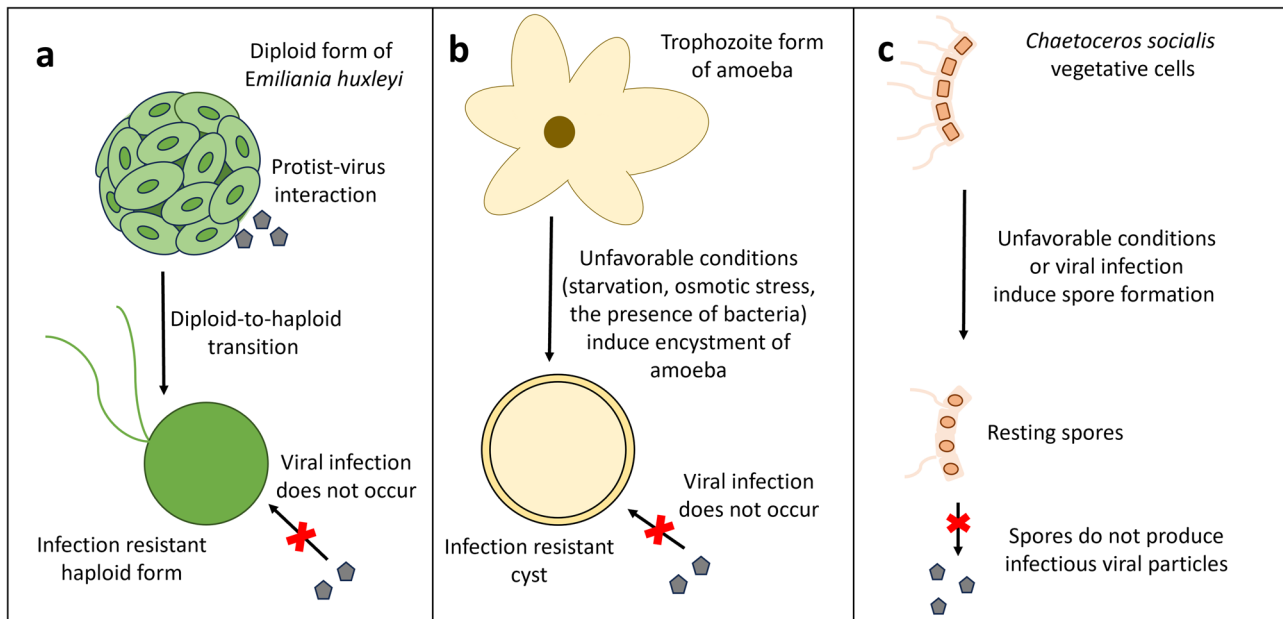


Fig. 3 | Overview of the strategies employed by different protist life forms to resist stress factors, such as virus infection. a Upon interaction with viruses, the cocolithophore *E. huxleyi* shifts to a life form that is resistant to infection¹⁹⁵. **b** Amoebae encyst under unfavorable conditions, and the cysts formed are not able to be infected

by a virus²⁰⁶. **c** Under unfavorable conditions *Chaetoceros socialis* cells transform into resting spores that are unable to produce infectious viral particles^{114,194,225}. Red text: Cellular resistance strategies after stress exposure.

temperature, while the cyst is the form of resistance^{191,206}. Under unfavorable conditions such as starvation, or osmotic stress, amoeba trophozoites undergo both cellular and molecular regulatory processes that lead to encystment^{206–208}. Amoeba cysts are more resistant to adverse conditions. For instance, *A. castellanii* cysts can survive five cycles of freeze–thawing, exposure to high doses of UV or gamma radiation²⁰⁹. Furthermore, giant viruses, such as mimiviruses and marseilleviruses, can only infect amoeba when they are in the trophozoite form. The shift to a non-permissive cell stage is an astounding stratagem for escaping giant viruses²⁰⁶. Some viruses, however, have developed strategies to circumvent this resistance mechanism. Mimivirus isolates and Tupanvirus, can prevent the encystment of amoebae, by reducing the expression of amoebal encystment-mediating subtilisin-like serine proteinase, a proteinase involved in trophozoite encystment. By doing so, the virus can effectively block the formation of the host’s form of resistance and continue its cycle^{90,206,210}.

The tripartite systems

The tripartite systems are an interesting dynamic in which the giant virus–host relationship is accompanied by a further member: a virophage or a bacteria. Such tripartite systems are found, for instance in amoebae. Virophages are viruses capable of infecting giant viruses, they multiply inside the VFs, meaning that they do not replicate if giant viruses are absent. Therefore, the replication of the virophages interferes with the cycle of the giant virus, interrupting it and thus reducing the amoeba mortality related to the viral infection^{79,211}. The first virophage discovered was sputnik, a dsDNA virus associated with mamavirus. Some types of virophages increase the formation of abnormal giant virus particles, reduce infectivity and the ability to lyse their host cell²¹¹. The second virophage discovered was the mavirus associated with the Cafeteria roenbergensis virus (CroV). Like the sputnik, this virophage inhibits the cycle of the giant virus. Interestingly, mavirus can integrate its genome into the protist’s genome, but its genes are only expressed when CroV infection occurs. This reactivation is not enough to prevent cell lysis; however, it causes mavirus particles to be released into the environment and protect neighboring cells^{79,212,213}. Despite this, it has been shown that not all virophages negatively affect the cycle of giant viruses; zamilon, for instance, does not affect the ability of the giant virus to lyse the amoeba²¹⁴. There are also bacterial endosymbionts capable of protecting

amoebae from being infected by giant viruses, such as *Parachlamydia acanthamoebae*, which manages to suppress the viral replication of sympatric Viennavirus, APMV and Tupanvirus by inhibiting the maturation of the VF, which results ultimately in the survival of the infected amoebae²¹⁵. Such complex systems are also present in other protists, such as *Cryptomonas* sp. SAG25.80, which is a quadripartite system²¹⁶. A single cell harbors a phage (MAnkyphage) and two bacterial endosymbionts (*Grellia numerosa* and *Megaira polyxenophila*), and a complex community of organelles and selfish elements²¹⁶. As discussed above, protist organisms have developed various strategies throughout their evolutionary history to survive unfavorable environmental conditions and escape viral infection. A graphical representation of the main strategies discussed is shown by Fig. 3.

Summary and concluding remarks

Early eukaryotes are believed to have emerged more than a billion years ago in the Proterozoic oceans²¹⁷. Despite the ongoing efforts to characterize and explore the diversity of viruses that infect protists, few isolates have been described to date, and the majority of the known diversity was discovered through metagenomic studies. One of the most notable groups of viruses, with the higher number of viral isolates, are the representatives of the phylum *Nucleocytoviricota*, an ancient component of the eukaryotic virome^{32,218}. Each of these organisms have undergone extensive co-evolution, resulting in their present-day diversity, which encompasses a broad array of eukaryotes as hosts, and different taxa of viruses as parasites⁴⁸. Even though certain viruses of this phylum possess a highly diverse set of genes involved in different metabolic pathways, their obligated intracellular parasitic nature necessitates an intricate relationship with their hosts.

Viruses often disrupt normal cellular processes to acquire the necessary elements for viral replication, or as a result of dysbiosis originated from the infection process. The intensification of studies on viral–protists host interactions is enhancing our understanding of the molecular mechanisms underlying their interactions, shedding light on viral replication and host defense mechanisms. Following viral infection, host cells often go through significant alterations and begin to exhibit a distinct nature⁴⁹. Some of the alterations can be observed microscopically and are considered as an indicative of viral infection. These particular alterations, known as cytopathic effects, typically comprise morphological changes that may manifest as

noticeable variations in cell shape, size and integrity. In the case of protists, it has been observed that these changes can include increased cellular motility, rounding of cells, reduced adhesion, or increased adhesion to other cells, and cell lysis^{12,80–83,85–92}. Furthermore, morphological modifications are accompanied by intracellular alterations. During a viral infection, intracellular changes in protists cells include structural transformations of the cytoskeleton, degradation of chloroplasts or photosynthetic pigments (if present), recruitment of mitochondria, membranes, vesicles, etc. Even if the VF is exclusively formed in the cytoplasm and the nucleus remains intact throughout viral replication, it can still go through changes, albeit temporary, during the course of the infection^{12,66,109,117,128,133,219,220}. In addition, viral infections induce functional changes in host cells through widespread genetic and metabolic reprogramming. Apart from inducing the expression of viral genes, viruses can elevate the expression of host genes associated with processes such as DNA synthesis, energy generation, and the modification of lipid, protein, and nucleic acid biosynthesis pathways. These alterations collectively contribute to the complex interplay between viruses and host cells during infection^{62,117,135–138,140,144,153,154,167}. Still, deeper exploration of virus-host dynamics is much needed, and can help elucidate host factors influencing susceptibility, pathogenicity, resistance, and protists basic cytology.

As aforementioned, protists are a diverse group of eukaryotic organisms that exhibit a remarkable adaptability when exposed to harsh conditions and invasive encounters. To thrive in ever-changing environments and fend off predators and parasites, protists have evolved a repertoire of sophisticated cellular responses to stress, often including the formation of resistant life forms. Moreover, as they occupy a wide range of ecological niches, protists have a dynamic interplay with other organisms with which they form communities, including viruses. They can act as regulators of population diversity and density, as in the case of *Emiliana huxleyi* viruses, which are responsible for ending coccolithophorid blooms^{195,197}. Furthermore, the interaction between viruses and protists can also be very complex, as in tripartite systems, in which the virus-host relationship involves another member which may interfere in the replication cycle of the giant virus and protect amoebae from infection^{79,212,213}. Competitive interactions are one of the main driving forces that lead to the diversity and complexity of life on our planet, and the investigation into how viruses influence protists communities, and their ecological interactions can help understand how virus-driven evolution shapes the diversity, dynamics and the impacts in ecosystems, including their role in nutrient cycling and energy flow.

Many are the taxonomic groups of viruses that infect protists, and together, they are present in the majority of Earth's ecosystems. One outcome of such interactions is horizontal gene transfer. Viruses might act as agents for transferring genetic material across species boundaries, including protists, while certain species are hot spots for horizontal gene transfer (HGT) among viruses, eukaryotes, prokaryotes and mobile elements^{160,221}. This process has the potential to introduce novel genes or traits into protist genomes, and potentially influence their biology, adaptation, and evolution²²². Furthermore, it contributes to studies on the evolution of protists and its viruses, providing insights into the coevolutionary dynamics, and as these organisms often have unique genomic features with a high percentage of ORFan genes⁶⁰, the study of the viral genomes can uncover novel genes and genetic features that may be noteworthy in protist hosts. This can expand our understanding of genetic diversity, the impact of viral genes on protists' biology, ecology and evolution, as well as potential functions within the protists.

Protists and viruses play a crucial role in Earth's ecosystems. Understanding how viruses impact protist biology can provide valuable insights into several fields of science, shedding light on evolutionary biology, ecosystem dynamics, nutrient cycling, and biomedical research. However, our knowledge of unicellular organisms and microorganisms known to humankind remains anthropocentric, with little known about the true diversity of these beings. Therefore, it is important that prospecting and characterization studies of these organisms are carried out to better elucidate the complete picture. In summary, viruses can serve as valuable tools and

subjects of study in the field of protist biology. Their interactions with protist hosts, unique genomes, and ecological roles can offer new information that enhances our understanding of protist biology and its broader implications for ecosystems and biotechnology.

Reporting summary

Further information on research design is available in the Nature Portfolio Reporting Summary linked to this article.

Data availability

No datasets were generated or analysed for this review paper. Literature cited is shown in the reference list and in the Supplementary Data File.

Received: 28 October 2023; Accepted: 29 February 2024;

Published online: 11 March 2024

References

- Owen, R. Kingdom *Protozoa in Paleontology*. 1–17 (Edinburgh, Colin Macfarquhar & Andrew Bell, 1858).
- Cavalier-Smith, T. *Kingdom Protozoa and Its 18 Phyla. Microbiol. Rev.* **57**, 953–994 (1993).
- Jahn, T. L. & Votta, J. J. Locomotion of protozoa. *Annu. Rev. Fluid Mech.* **4**, 93–116 (1972).
- Adl, S. M. et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryotic Microbiol.* **52**, 399–451 (2005).
- Caron, D. A., Worden, A. Z., Countway, P. D., Demir, E., & Heidelberg, K. B. Protists are microbes too: a perspective. *ISME J.* **3**, 4–12 (2009).
- Adl, S. M. et al. Diversity, nomenclature, and taxonomy of protists. *Syst. Biol.* **56**, 684–689 (2007).
- Brusca, R., Shuster, S. & Moore, W. *Invertebrates* (2016).
- da Silva Ferreira, M., de Souza Gonçalves, D., Medeiros, E. G., Peralta, J. M. & Guimarães, A. J. “Feast-Fit-Fist-Feat”: overview of free-living amoeba interactions with fungi and virulence as a foundation for success in battle. *Curr. Trop. Med. Rep.* **8**, 18–31 (2021).
- Mungroo, M. R., Siddiqui, R. & Khan, N. A. War of the microbial world: *Acanthamoeba* spp. interactions with microorganisms. *Folia Microbiologica* **66**, 689–699 (2021).
- Queiroz, V. F. et al. Amoebae: hiding in plain sight: unappreciated hosts for the very large viruses. *Annu. Rev. Virol.* **9**, 79–98 (2022).
- Korn, E. D. & Weisman, R. A. Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba*. II. Electron microscopic study of the initial events. *J. Cell Biol.* **34**, 219–227 (1967).
- Souza, F. et al. In-depth analysis of the replication cycle of Orpheovirus. *Virol J.* **16**, 158 (2019).
- Silva, L. C. F. et al. Microscopic analysis of the tupanvirus cycle in *Vermamoeba vermiformis*. *Front. Microbiol.* **10**, 671 (2019).
- Andrade, A.C.S.P. et al. Filling knowledge gaps for mimivirus entry, uncoating, and morphogenesis. *J. Virol.* **91**, e01335-17 (2017).
- Arantes, T. S. et al. The large marseillevirus explores different entry pathways by forming giant infectious vesicles. *J. Virol.* **90**, 5246–5255 (2016).
- Shi, Y. et al. The ecology and evolution of amoeba-bacterium interactions. *Appl. Environ. Microbiol.* **87**, e01866-20 (2021).
- Scola, B. L. et al. A giant virus in amoebae. *Science* **299**, 2033 (2003).
- Horn, M. Bacterial endosymbionts of free-living amoebae. *J. Eukaryot. Microbiol.* **51**, 509–514 (2004).
- Samba-Louaka, A., Delafont, V., Rodier, M. H., Cateau, E. & Héchar, Y. Free-living amoebae and squatters in the wild: ecological and molecular features. *FEMS Microbiol. Rev.* **43**, 415–434 (2019).
- de Souza, G. A. P., Queiroz, V. F., Coelho, L. F. L. & Abrahão, J. S. Alohomora! What the entry mechanisms tell us about the evolution

- and diversification of giant viruses and their hosts. *Curr. Opin. Virol.* **47**, 79–85 (2021).
21. Kao, S., Kao, C.-F., Chang, W. & Ku, C. Widespread distribution and evolution of poxviral entry-fusion complex proteins in giant viruses. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0494422 (2023).
 22. De la Fuente, I. M. et al. The nucleus does not significantly affect the migratory trajectories of amoeba in two-dimensional environments. *Sci. Rep.* **9**, 16369 (2019).
 23. DuBose, J. G., Robeson, M. S., Hoogshagen, M., Olsen, H. & Haselkorn, T. S. Complexities of inferring symbiont function: paraburkholderia symbiont dynamics in social amoeba populations and their impacts on the amoeba microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **88**, e0128522 (2022).
 24. De la Fuente, I. M. & López, J. I. Cell motility and cancer. *Cancers* **12**, 2177 (2020).
 25. Jeon, K. W. Nuclear control of cell movement in amoebae: nuclear transplantation study. *Exp. Cell Res.* **50**, 467–471 (1967).
 26. Lhee, D. et al. Amoeba genome reveals dominant host contribution to plastid endosymbiosis. *Mol. Biol. Evol.* **38**, 344–357 (2021).
 27. Schulz, F. et al. Life in an unusual intracellular niche: a bacterial symbiont infecting the nucleus of amoebae. *ISME J.* **8**, 1634–1644 (2014).
 28. Shu, L. et al. Symbiont location, host fitness, and possible coadaptation in a symbiosis between social amoebae and bacteria. *Elife* **7**, 1–25 (2018).
 29. Thomas, V. & Greub, G. Amoeba/amoebal symbiont genetic transfers: lessons from giant virus neighbours. *Intervirology* **53**, 254–267 (2010).
 30. Enquist, L. W. Virology in the 21st century. *J. Virol.* **83**, 5296–5308 (2009).
 31. Wang, A. L. & Wang, C. C. Viruses of parasitic protozoa. *Parasitol. Today* **7**, 76–80 (1991).
 32. Krupovic, M., Dolja, V. V. & Koonin, E. V. The virome of the last eukaryotic common ancestor and eukaryogenesis. *Nat. Microbiol.* **8**, 1008–1017 (2023).
 33. Oldstone, M. B. A. & Levine, A. J. Virology in the next millennium minireview achievements led to the eradication of viral diseases. *Cell* **100**, 139–142 (2000).
 34. Hershey, A. D. & Chase, M. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage*. *J. Gen. Physiol.* **36**, 39–56 (1952).
 35. Hendrix, R. W. There 1031 virus particles on earth, or more, or fewer? *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **96**, 2192–2197 (1999).
 36. Li, T. et al. CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. *Sig. Transduct. Target. Ther.* **8**, 36 (2023).
 37. Rodrigues, R. A. L. et al. An anthropocentric view of the virosphere-host relationship. *Front. Microbiol.* **8**, 1673 (2017). **Demonstration that the known virosphere is extremely anthropocentric and that viruses that infect protists are among the least described ones.**
 38. Suttle, C. A. Viruses in the sea. *Nature* **437**, 356–361 (2005).
 39. Miller, J. H. & Swartzwelder, J. C. Virus-like particles in an *Entamoeba histolytica* Trophozoite. *Source: J. Parasitol.* **46**, 523 (1960).
 40. Attoui, H. et al. Micromonas pusilla reovirus: a new member of the family *Reoviridae* assigned to a novel proposed genus (Mimoreovirus). *J. General Virol.* **87**, 1375–1383 (2006).
 41. Coy, S., Gann, E., Pound, H., Short, S. & Wilhelm, S. Viruses of eukaryotic algae: diversity, methods for detection, and future directions. *Viruses* **10**, 487 (2018).
 42. Diamond, L. S. & Mattern, C. F. T. Protozoal viruses. *Adv. Virus Res.* **20**, 87–112 (1976).
 43. Fukuhara, T. Endornaviruses: persistent dsRNA viruses with symbiotic properties in diverse eukaryotes. *Virus Genes* **55**, 165–173 (2019).
 44. Khrantsov, N. V. & Upton, S. J. Association of RNA polymerase complexes of the parasitic protozoan *Cryptosporidium parvum* with virus-like particles: heterogeneous system †. *J. Virol.* **74**, 5788–5795 (2000).
 45. Malathi, V. G. & Renuka Devi, P. ssDNA viruses: key players in global virome. *Virus Dis.* **30**, 3–12 (2019).
 46. Nibert, M. L., Woods, K. M., Upton, S. J. & Ghabrial, S. A. Cryspovirus: a new genus of protozoan viruses in the family *Partitiviridae*. *Arch. Virol.* **154**, 1959–1965 (2009).
 47. Short, S. M., Staniewski, M. A., Chaban, Y. V., Long, A. M. & Wang, D. Diversity of viruses infecting eukaryotic algae. *Curr. Issues Mol. Biol.* **39**, 29–62 (2020).
 48. Koonin, E. V. et al. Global organization and proposed megataxonomy of the virus world. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **84**, e00061-19 (2020).
 49. Forterre, P. The virocell concept and environmental microbiology are the great virus comeback. *ISME J.* **7**, 233–236 (2013). **Emphasizes the dynamics and importance of viral infections in nature.**
 50. De Castro, I. F., Volonté, L. & Risco, C. Virus factories: biogenesis and structural design. *Cell. Microbiol.* **15**, 24–34 (2013).
 51. Bisio, H. et al. Evolution of giant pandoravirus revealed by CRISPR/Cas9. *Nat Commun* **14**, 428 (2023).
 52. La Scola, B. Looking at protists as a source of pathogenic viruses. *Microb. Pathog.* **77**, 131–135 (2014).
 53. Diesend, J., Kruse, J., Hagedorn, M. & Hammann, C. Amoebae, giant viruses, and virophages make up a complex, multilayered threesome. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 527 (2018).
 54. Machado, T. B., de Aquino, I. L. M. & Abrahão, J. S. Isolation of giant viruses of *Acanthamoeba castellanii*. *Curr. Protoc.* **2**, e455 (2022).
 55. Philippe, N. et al. Pandoraviruses: Amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. *Science (1979)* **341**, 281–286 (2013).
 56. Alempic, J. M. et al. An update on eukaryotic viruses revived from ancient permafrost. *Viruses* **15**, 564 (2023). **Isolation and characterization of 13 viruses from siberian permafrost samples.**
 57. Akashi, M. & Takemura, M. Co-isolation and characterization of two pandoraviruses and a mimivirus from a riverbank in Japan. *Viruses* **11**, 1123 (2019).
 58. Yoshikawa, G. et al. Medusavirus, a novel large DNA virus discovered from hot spring water. *J. Virol.* **93**, e02130-18 (2019).
 59. Fabre, E. et al. Noumeavirus replication relies on a transient remote control of the host nucleus. *Nat. Commun.* **8**, 15087 (2017).
 60. Boratto, P. V. M. et al. Yaravirus: a novel 80-nm virus infecting *Acanthamoeba castellanii*. *PNAS* **117**, 16579–16586 (2020).
 61. Abrahão, J. et al. Tailed giant Tupanvirus possesses the most complete translational apparatus of the known virosphere. *Nat. Commun.* **9**, 749 (2018).
 62. Legendre, M. et al. In-depth study of Mollivirus sibericum, a new 30,000-yold giant virus infecting *Acanthamoeba*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **112**, E5327–E5335 (2015).
 63. Queminn, E. R. et al. Complex membrane remodeling during virion assembly of the 30,000-year-old mollivirus sibericum. *J. Virol.* **93**, e00388-19 (2019).
 64. Christo-Foroux, E. et al. Characterization of Mollivirus kamchatka, the first modern representative of the proposed Molliviridae family of giant viruses. *J. Virol.* **94**, e01997-19 (2020).
 65. Pereira Andrade, A.C.S. et al. New isolates of pandoraviruses: contribution to the study of replication cycle steps. *J. Virol.* **93**, e01942-18 (2019).
 66. Fukaya, S., Masuda, L. & Takemura, M. Analysis of morphological changes in the nucleus and vacuoles of *Acanthamoeba castellanii* following giant virus infection. *Microbiol. Spectr.* **11**, e0418222 (2023). **Changes on the nucleus, vacuoles and A. castellanii cell shape are triggered during four different giant virus infection.**

67. Goyal, N., Barai, A., Sen, S. & Kondabagil, K. Amoebal tubulin cleavage late during infection is a characteristic feature of mimivirus but not of marseillevirus. *Microbiol. Spectr.* **10**, e0275322 (2022).
68. Legendre, M. et al. Thirty-thousand-year-old distant relative of giant icosahedral DNA viruses with a pandoravirus morphology. *PNAS* **111**, 4274–4279 (2014).
69. Legendre, M. et al. Diversity and evolution of the emerging *Pandoraviridae* family. *Nat. Commun.* **9**, 2285 (2018).
70. Takemura, M. Morphological and Taxonomic properties of Tokyovirus, the first Marseilleviridae member isolated from Japan. *Microbes Environ.* **31**, 442–448 (2016).
71. Bertelli, C. et al. *Cedratvirus lausannensis* – digging into *Pithoviridae* diversity. *Environ. Microbiol.* **19**, 4022–4034 (2017).
72. Doutre, G., Philippe, N., Abergel, C. & Claverie, J.-M. Genome analysis of the first Marseilleviridae representative from Australia indicates that most of its genes contribute to virus fitness. *J. Virol.* **88**, 14340–14349 (2014).
73. Silva, L. K. S. et al. Cedratvirus getuliensis replication cycle: an in-depth morphological analysis. *Sci. Rep.* **8**, 4000 (2018).
74. Thomas, V. et al. Lausannevirus, a giant amoebal virus encoding histone doublets. *Environ. Microbiol.* **13**, 1454–1466 (2011).
75. Campos, R. K. et al. Samba virus: a novel mimivirus from a giant rain forest, the Brazilian Amazon. *Virol. J.* **11**, 95 (2014).
76. Arslan, D., Legendre, M., Seltzer, V., Abergel, C. & Claverie, J. M. Distant Mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of *Megaviridae*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **108**, 17486–17491 (2011).
77. Aoki, K. et al. *Marseilleviridae* lineage b diversity and bunch formation inhibited by galactose. *Microbes Environ.* **36**, n/a (2021).
78. Scheid, P. L. New insights into the interaction of free-living amoebae and pandoravirus inopinatum: investigations of the host range and the role of multilamellar bodies. *Open Parasitol. J.* **6**, 63–74 (2018).
79. Oliveira, G., La Scola, B. & Abrahão, J. Giant virus vs amoeba: fight for supremacy. *Virol. J.* **16**, 126 (2019).
80. Fukaya, S. & Takemura, M. Kinetic analysis of *Acanthamoeba castellanii* infected with giant viruses quantitatively revealed process of morphological and behavioral changes in host cells. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0036821 (2021). **Time lapse videos identified cell changes, such as rounding, and behaviour, such as rotation, in A. castellanii after infection of different giant viruses.**
81. Oliveira, G. et al. Tupanvirus-infected amoebas are induced to aggregate with uninfected cells promoting viral dissemination. *Sci. Rep.* **9**, 183 (2019).
82. Aoki, K. et al. Fifteen marseilleviruses newly isolated from three water samples in Japan reveal local diversity of marseilleviridae. *Front. Microbiol.* **10**, 1152 (2019).
83. Suzan-Monti, M., Scola, B. L., Barrassi, L., Espinosa, L. & Raoult, D. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* Mimivirus. *PLoS One* **2**, e328 (2007).
84. Mutsafi, Y., Shimon, E., Shimon, A. & Minsky, A. Membrane assembly during the infection cycle of the giant mimivirus. *PLoS Pathog.* **9**, e1003367 (2013).
85. Yaakov, L. B., Mutsafi, Y., Porat, Z., Dadosh, T. & Minsky, A. Kinetics of mimivirus infection stages quantified using image flow cytometry. *Cytometry Part A* **95**, 534–548 (2019).
86. Boyer, M. et al. Giant Marseillevirus highlights the role of amoebae as a melting pot in emergence of chimeric microorganisms. *PNAS* **106**, 21848–21853 (2009).
87. Dos Santos, R. N. et al. A new marseillevirus isolated in Southern Brazil from *Limnoperna fortunei*. *Sci. Rep.* **6**, 35237 (2016).
88. Rolland, C. et al. Clandestinovirus: a giant virus with chromatin proteins and a potential to manipulate the cell cycle of its host *Vermamoeba vermiformis*. *Front. Microbiol.* **12**, 715608 (2021).
89. Bajrai, L. et al. Kaumobavirus, a new virus that clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses* **8**, 278 (2016).
90. Borges, I. et al. Trapping the Enemy: *Vermamoeba vermiformis* circumvents faustovirus mariensis dissemination by enclosing viral progeny inside cysts. *J. Virol.* **93**, e00312-19 (2019).
91. Andreani, J. et al. Orpheovirus IHUMI-LCC2: a new virus among the giant viruses. *Front. Microbiol.* **8**, 2643 (2018).
92. Andreani, J. et al. Morphological and genomic features of the new Klosneuvirinae isolate fadolivirus IHUMI-VV54. *Front. Microbiol.* **12**, 719703 (2021).
93. Bajrai, L. H. et al. Isolation of Yasminevirus, the first member of Klosneuvirinae isolated in coculture with *Vermamoeba vermiformis*, demonstrates an extended arsenal of translational apparatus components. *J. Virol.* **94**, e01534-19 (2019).
94. Reteno, D. G. et al. Faustovirus, an Asfarvirus-related new lineage of giant viruses infecting amoebae. *J. Virol.* **89**, 6585–6594 (2015).
95. Popovic, M., Samgadharan, M. G., Read, E. & Gallo, R. C. Isolation of virus capable of lysing the brown tide microalga, *Aureococcus Anophagefferens*. *Biophys. Res. Commun.* **224**, 497–500 (1984).
96. Gastrich, M. D. et al. Ultrastructural analysis of viral infection in the brown-tide alga, *Aureococcus Anophagefferens* (*Pelagophyceae*). *Phycologia* **37**, 300–306 (1998).
97. Gastrich, M. D. et al. Viruses as potential regulators of regional brown tide blooms caused by the alga, *Aureococcus anophagefferens*. *Estuaries* **27**, 112–119 (2004).
98. Gastrich, M. D., Anderson, O. R. & Cosper, E. M. Viral-like particles (VLPs) in the alga, *Aureococcus anophagefferens* (*pelagophyceae*), during 1999–2000 brown tide blooms in Little Egg Harbor, New Jersey. *Estuarine Res. Federation Estuaries* **25**, 938–943 (2002).
99. Gobler, C., Anderson, O., Gastrich, M., Mary Downes, G. & Wilhelm, S. Ecological aspects of viral infection and lysis in the harmful brown tide alga *Aureococcus anophagefferens*. *Aquatic Microbial Ecol.* **47**, 25–36 (2007).
100. Nagasaki, K., Ando, M., Itakura, S., Imai, I. & Ishida, Y. Viral mortality in the final stage of *Heterosigma Akashiwo* (*Raphidophyceae*) red tide. *J. Plankton Res.* **16**, 1595–1599 (1994).
101. Lawrence, J. E., Chan, A. M. & Suttle, C. A. A novel virus (HaNIV) causes lysis of the toxic bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) 1. *J. Phycol.* **37**, 216–222 (2001).
102. Nagasaki, K., Tarutani, K. & Yamaguchi, M. Growth characteristics of heterosigma Akashiwo virus and its possible use as a microbiological agent for red tide control. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 898–902 (1999).
103. Nagasaki, K. & Yamaguchi, M. Isolation of a virus infectious to the harmful bloom causing microalga *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*). *Aquatic Microbial Ecol.* **13**, 135–140 (1997).
104. Juneau, P., Lawrence, J., Suttle, C., Curtis, P. & Harrison, P.J. Effects of viral infection on photosynthetic processes in the bloom-forming alga *Heterosigma akashiwo*. *Aquatic Microbial Ecol.* **31**, 9–17 (2003).
105. Tai, V. et al. Characterization of HaRNAV, a single-stranded RNA virus causing lysis of *Heterosigma akashiwo* (*Raphidophyceae*) 1. *J. Phycol.* **39**, 343–352 (2003).
106. Mirza, S. F. et al. Isolation and characterization of a virus infecting the freshwater algae *Chrysochromulina parva*. *Virology* **486**, 105–115 (2015).
107. Wagstaff, B. et al. Isolation and characterization of a double stranded DNA megavirus infecting the toxin-producing haptophyte *Prymnesium parvum*. *Viruses* **9**, 40 (2017).
108. Tomaru, Y. et al. New single-stranded DNA virus with a unique genomic structure that infects marine diatom *Chaetoceros setoensis*. *Sci. Rep.* **3**, 3337 (2013).
109. Shirai, Y. et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the marine planktonic diatom *Chaetoceros tenuissimus* meunier. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 4022–4027 (2008).
110. Kimura, K. & Tomaru, Y. Isolation and characterization of a single-stranded DNA virus infecting the marine diatom *Chaetoceros* sp.

- Strain SS628-11 isolated from western Japan. *PLoS One* **8**, e82013 (2013).
111. Kimura, K. & Tomaru, Y. Discovery of two novel viruses expands the diversity of single-stranded DNA and single-stranded RNA viruses infecting a cosmopolitan marine diatom. *Appl. Environ. Microbiol.* **81**, 1120–1131 (2015).
 112. Nagasaki, K. et al. Isolation and characterization of a novel single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Rhizosolenia Setigera*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 704–711 (2004).
 113. Tomaru, Y. et al. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus that infects the marine planktonic diatom *Chaetoceros* sp. (SS08-C03). *Phycolog. Res.* **61**, 27–36 (2013).
 114. Tomaru, Y., Takao, Y., Suzuki, H., Nagumo, T. & Nagasaki, K. Isolation and characterization of a single-stranded RNA virus infecting the bloom-forming diatom *Chaetoceros socialis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**, 2375–2381 (2009a).
 115. Nagasaki, K. et al. Previously unknown virus infects marine diatom. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 3528–3535 (2005).
 116. Vincent, F., Sheyn, U., Porat, Z., Schatz, D. & Vardi, A. Visualizing active viral infection reveals diverse cell fates in synchronized algal bloom demise. *PNAS* **118**, e2021586118 (2021).
 117. Rosenwasser, S. et al. Rewiring host lipid metabolism by large viruses determines the fate of *Emiliana huxleyi*, a bloom-forming alga in the ocean. *Plant Cell* **26**, 2689–2707 (2014).
 118. Nissimov, J. I. et al. Dynamics of transparent exopolymer particle production and aggregation during viral infection of the coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *Environ. Microbiol.* **20**, 2880–2897 (2018).
 119. Yuxuan, X. et al. Virus-induced autophagy in the marine coccolithophorid *Emiliana Huxleyi*. *Haiyang Xuebao* **45**, 143–154 (2023).
 120. Visvesvara, G. S. Giardiasis: an overview. *IMJ. Illinois Med. J.* **164**, 34–39 (1983).
 121. Lagunas-Rangel, F. A., Kameyama-Kawabe, L. Y. & Bermúdez-Cruz, R. M. Giardiasis: an update. *Parasitol Res.* **120**, 1943–1948 (2021).
 122. Cao, L. et al. *Giardia canis*: ultrastructural analysis of *G. canis* trophozoites transfected with full length *G. canis* virus cDNA transcripts. *Exp. Parasitol.* **123**, 212–217 (2009).
 123. Miller, R. L., Wang, A. L. & Wang, C. C. Purification and characterization of the *Giardia Lamblia* double-stranded RNA virus. *Mol. Biochem. Parasitol.* **28**, 189–195 (1988).
 124. Marucci, G. et al. Re-discovery of giardiasis: genomic and functional analysis of viruses from *Giardia duodenalis* isolates. *Biomedicines* **9**, 654 (2021).
 125. Horiguchi, T. *Heterocapsa circularisquama* sp. nov. (*Peridinales, Dinophyceae*): a new marine dinoflagellate causing mass mortality of bivalves in Japan. *Phycologica Res.* **43**, 129–136 (1995).
 126. Tarutani, K., Nagasaki, K., Itakura, S. & Yamaguchi, M. Isolation of a virus infecting the novel shellfish-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Microbial Ecol.* **23**, 103–111 (2001).
 127. Takano, Y., Tomaru, Y. & Nagasaki, K. Visualization of a dinoflagellate-infecting virus HcDNAV and its infection process. *Viruses* **10**, 554 (2018).
 128. Coy, S. R. et al. Visualization of RNA virus infection in a marine protist with a universal biomarker. *Sci. Rep.* **13**, 5813 (2023).
 129. Tomaru, Y., Mizumoto, H. & Nagasaki, K. Virus resistance in the toxic bloom-forming dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to single-stranded RNA virus infection. *Environ. Microbiol.* **11**, 2915–2923 (2009b).
 130. Tomaru, Y. et al. Isolation and characterization of two distinct types of HcRNAV, a single-stranded RNA virus infecting the bivalve-killing microalga *Heterocapsa circularisquama*. *Aquatic Microbial Ecol.* **34**, 207–218 (2004).
 131. Mizumoto, H., Tomaru, Y., Takao, Y., Shirai, Y. & Nagasaki, K. Diverse responses of the bivalve-killing dinoflagellate *Heterocapsa circularisquama* to infection by a single-stranded RNA virus. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 3105–3111 (2008).
 132. Weynberg, K. D. et al. Prevalent and persistent viral infection in cultures of the coral algal endosymbiont *Symbiodinium*. *Coral Reefs* **36**, 773–784 (2017).
 133. Nakano, S., Suzuki, S. I. & Onji, M. Virus-like particles suppress growth of the red-tide-forming marine Dinoflagellate *Gymnodinium mikimotoi*. *Mar. Biotechnol.* **5**, 435–442 (2003).
 134. Takao, Y., Nagasaki, K. & Honda, D. Squashed ball-like dsDNA virus infecting a marine fungoid protist *Sicyodochytrium minutum* (*Thraustochytriaceae, Labyrinthulomycetes*). *Aquatic Microbial Ecol.* **49**, 101–108 (2007).
 135. Westermann, A. J., Gorski, S. A. & Vogel, J. Dual RNA-seq of pathogen and host. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**, 618–630 (2012).
 136. Lum, K. K. & Cristea, I. M. Proteomic approaches to uncovering virus-host protein interactions during the progression of viral infection. *Expert Rev. Proteom.* **13**, 325–340 (2016).
 137. Rodrigues, R. A. L. et al. Analysis of a Marseillevirus transcriptome reveals temporal gene expression profile and host transcriptional shift. *Front. Microbiol.* **11**, 651 (2020). **Giant virus infection rapidly triggers the downregulation of genes related to host transcriptional machinery.**
 138. Zhang, R., Endo, H., Takemura, M. & Ogata, H. RNA sequencing of medusavirus suggests remodeling of the host nuclear environment at an early infection stage. *Microbiol. Spectr.* **9**, e0006421 (2021).
 139. Rolland, C., La Scola, B. & Levasseur, A. How tupanvirus degrades the ribosomal RNA of its amoebal host? The ribonuclease T2 track. *Front. Microbiol.* **11**, 1691 (2020). **Tupanvirus soda lake virus infection triggers rRNA shutdown potentially through RNase T2 enzyme gene modulation.**
 140. Jones, B. M., Edwards, R. J., Skipp, P. J., O'Connor, C. D. & Iglesias-Rodriguez, M. D. Shotgun proteomic analysis of *Emiliana huxleyi*, a marine phytoplankton species of major biogeochemical importance. *Mar. Biotechnol.* **13**, 496–504 (2011).
 141. Schroeder, D. C., Oke, J., Malin, G. & Wilson, W. H. Coccolithovirus (*Phycodnaviridae*): characterisation of a new large dsDNA algal virus that infects *Emiliana huxleyi*. *Arch. Virol.* **147**, 1685–1698 (2002).
 142. Liu, J. et al. Characterization of the sphingolipid profiling of *Emiliana huxleyi* against virus infection. *J. Oceanol. Limnol.* **41**, 1547–1557 (2023).
 143. Pagarete, A., Allen, M. J., Wilson, W. H., Kimmanse, S. A. & De Vargas, C. Host-virus shift of the sphingolipid pathway along an *Emiliana huxleyi* bloom: survival of the fittest. *Environ. Microbiol.* **11**, 2840–2848 (2009).
 144. Schleyer, G. et al. In plaque-mass spectrometry imaging of a bloom-forming alga during viral infection reveals a metabolic shift towards odd-chain fatty acid lipids. *Nat. Microbiol.* **4**, 527–538 (2019).
 145. Evans, C., Pond, D. W. & Wilson, W. H. Changes in *Emiliana huxleyi* fatty acid profiles during infection with *E. huxleyi* virus 86: Physiological and ecological implications. *Aquatic Microb. Ecol.* **55**, 219–228 (2009).
 146. Hunter, J. E., Frada, M. J., Fredricks, H. F., Vardi, A. & Van Mooy, B. A. S. Targeted and untargeted lipidomics of *Emiliana huxleyi* viral infection and life cycle phases highlights molecular biomarkers of infection, susceptibility, and ploidy. *Front. Mar. Sci.* **2**, 81 (2015).
 147. Malitsky, S. et al. Viral infection of the marine alga *Emiliana huxleyi* triggers lipidome remodeling and induces the production of highly saturated triacylglycerol. *New Phytol.* **210**, 88–96 (2016).
 148. Kegel, J. U. et al. Transcriptional host-virus interaction of *Emiliana huxleyi* (*Haptophyceae*) and EhV-86 deduced from combined analysis of expressed sequence tags and microarrays. *Eur. J. Phycol.* **45**, 1–12 (2010).

149. Sheyn, U. et al. Expression profiling of host and virus during a coccolithophore bloom provides insights into the role of viral infection in promoting carbon export. *ISME J.* **12**, 704–713 (2018).
150. Pagarete, A. et al. Unveiling the transcriptional features associated with coccolithovirus infection of natural *Emiliana huxleyi* blooms. *FEMS Microb. Ecol.* **78**, 555–564 (2011).
151. Hevroni, G., Vincent, F., Sheyn, U., Vardi, A., & Ku, C. Daily turnover of active giant virus infection during algal blooms revealed by single-cell transcriptomics. *Sci. Adv.* **9**, 41 (2023).
152. Zhang, E. et al. MicroRNA-mediated regulation of lipid metabolism in virus-infected *Emiliana huxleyi*. *ISME J.* **16**, 2457–2466 (2022).
153. Ku, C. et al. A single-cell view on alga-virus interactions reveals sequential transcriptional programs and infection states. *Sci. Adv.* **6**, 1–10 (2020).
154. Feldmesser, E., Ben-Dor, S. & Vardi, A. An *Emiliana huxleyi* pan-transcriptome reveals basal strain specificity in gene expression patterns. *Sci. Rep.* **11**, 20795 (2021).
155. Xue, T. et al. Transcriptome analysis of marine microalga *Emiliana huxleyi* in response to virus infection[J]. *Haiyang Xuebao* **41**, 103–112 (2019).
156. Sheyn, U., Rosenwasser, S., Ben-Dor, S., Porat, Z. & Vardi, A. Modulation of host ROS metabolism is essential for viral infection of a bloom-forming coccolithophore in the ocean. *ISME J.* **10**, 1742–1754 (2016).
157. Schatz, D. et al. Hijacking of an autophagy-like process is critical for the life cycle of aDNA virus infecting oceanic algal blooms. *New Phytol.* **204**, 854–863 (2014).
158. Liu, J., Bratbak, G., Zheng, T. & Thyrhaug, R. Effects of virus infection on expression of cell cycle regulatory proteins in the unicellular marine algae *Emiliana huxleyi*. *Acta Oceanol. Sin.* **30**, 89–95 (2011).
159. Jingwen Liu. Virus infection disturbs cyclin expression, leading to cell cycle arrest in the unicellular marine algae *Emiliana huxleyi* and *Chrysochromulina ericina*. *Afr. J. Microbiol. Res.* **5**, 1801–1807 (2011).
160. Moniruzzaman, M., Gann, E. R. & Wilhelm, S. W. Infection by a giant virus (AaV) induces widespread physiological reprogramming in *Aureococcus anophagefferens* CCMP1984-A harmful bloom algae. *Front. Microbiol.* **9**, 752 (2018). **Giant virus infection triggers fast host transcriptional alterations, such as the suppression of transcripts related to photosynthesis, and activation of protein synthesis transcripts.**
161. Bale, N. J. et al. Fatty acid dynamics during viral infection of *Phaeocystis globosa*. *Aquatic Microb. Ecol.* **74**, 85–94 (2015).
162. Chen, S., Gao, K. & Beardall, J. Viral attack exacerbates the susceptibility of a bloom-forming alga to ocean acidification. *Glob. Chang. Biol.* **21**, 629–636 (2015).
163. Ray, J. L. et al. Virus infection of *Haptolina ericina* and *Phaeocystis pouchetii* implicates evolutionary conservation of programmed cell death induction in marine haptophyte-virus interactions. *J. Plankton Res.* **36**, 943–955 (2014).
164. Sheik, A. R. et al. Viral infection of *Phaeocystis globosa* impedes release of chitinous star-like structures: quantification using single cell approaches. *Environ. Microbiol.* **15**, 1441–1451 (2013).
165. Lawrence, S. A., Floge, S. A., Davy, J. E., Davy, S. K. & Wilson, W. H. Exploratory analysis of *Symbiodinium* transcriptomes reveals potential latent infection by large dsDNA viruses. *Environ. Microbiol.* **19**, 3909–3919 (2017).
166. Wang, A. L. & Wang, C. C. A linear double-stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *J. Biol. Chem.* **260**, 3697–3702 (1985).
167. Graves, K. J., Ghosh, A. P., Kissinger, P. J. & Muzny, C. A. *Trichomonas vaginalis* virus: a review of the literature. *Int. J. STD AIDS* **30**, 496–504 (2019).
168. Wang, A., Wang, C. C. & Alderete, J. F. “*Trichomonas vaginalis* phenotypic variation occurs only among trichomonads infected with the double-stranded RNA virus.”. *J. Exp. Med.* **166**, 1 (1987).
169. Khoshnan, A. & Alderete, J. F. “*Trichomonas vaginalis* with a double-stranded RNA virus has upregulated levels of phenotypically variable immunogen mRNA.”. *J. Virol.* **68**, 6 (1994).
170. Provenzano, D. & Alderete, J. F. Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas Vaginalis*. *Infect. Immun.* **63**, 3388–3395 (1995).
171. Provenzano, D., Khoshnan, A. & Alderete, J. F. Involvement of dsRNA virus in the protein composition and growth kinetics of host *Trichomonas vaginalis*. *Arch. Virol.* **142**, 939–952 (1997).
172. Goodman, R. P. et al. Clinical isolates of *Trichomonas vaginalis* concurrently infected by strains of up to four trichomonasvirus species (Family *Totiviridae*). *J. Virol.* **85**, 4258–4270 (2011).
173. Bessarab, I. N., Nakajima, R., Liu, H. W. & Tai, J. H. Identification and characterization of a type III *Trichomonas vaginalis* virus in the protozoan pathogen *Trichomonas vaginalis*. *Arch. Virol.* **156**, 285–294 (2011).
174. He, D. et al. Differential protein expressions in virus-infected and uninfected *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.* **55**, 121–128 (2017).
175. Rada, P. et al. Double-stranded RNA viruses are released from *Trichomonas vaginalis* inside small extracellular vesicles and modulate the exosomal cargo. *Front. Microbiol.* **13**, 893692 (2022).
176. Tarr, P. I. et al. LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania* (Leishmania *Braziliensis* Guyanensis/Single-Stranded RNA/Viral Particle/ Electron Microscopy). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 9572–9575 (1988).
177. Gupta, V. & Deep, A. An insight into the Leishmania RNA virus. *Indian J. Med. Microbiol.* **25**, 7–9 (2007).
178. Cantanhêde, L. M. et al. The maze pathway of coevolution: a critical review over the *Leishmania* and its endosymbiotic history. *Genes* **12**, 657 (2021).
179. Ives, A. et al. Leishmania RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis. *Science* **331**, 775–778 (2011).
180. Saura, A. et al. Elimination of LRVs elicits different responses in *Leishmania* spp. *mSphere* **7**, e0033522 (2022).
181. Kamoun, S. et al. The Top 10 oomycete pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* **16**, 413–434 (2015).
182. Botella, L. & Jung, T. Multiple viral infections detected in phytophthora condilina by total and small rna sequencing. *Viruses* **13**, 620 (2021).
183. Hannat, S. et al. Diverse trajectories drive the expression of a giant virus in the oomycete plant pathogen *Phytophthora Parasitica*. *Front. Microbiol.* **12**, 662762 (2021).
184. Uchida, K. et al. Two novel endornaviruses co-infecting a phytophthora pathogen of *Asparagus officinalis* modulate the developmental stages and fungicide sensitivities of the host oomycete. *Front. Microbiol.* **12**, 633502 (2021).
185. Mascia, T. et al. Infection of *Colletotrichum acutatum* and *Phytophthora infestans* by taxonomically different plant viruses. *Eur. J. Plant Pathol.* **153**, 1001–1017 (2019).
186. Cai, G., Fry, W. E. & Hillman, B. I. PiRV-2 stimulates sporulation in *Phytophthora infestans*. *Virus Res.* **271**, 197674 (2019).
187. Poimala, A. et al. Bunyaviruses affect growth, sporulation, and Elicitin production in *Phytophthora cactorum*. *Viruses* **14**, 2596 (2022).
188. Kamoun, S. A catalogue of the effector secretome of plant pathogenic oomycetes. *Ann. Rev. Phytopathol.* **44**, 41–60 (2006).
189. Kharel, A., Islam, M. T., Rookes, J. & Cahill, D. How to unravel the key functions of cryptic oomycete elicitor proteins and their role in plant disease. *Plants* **10**, 1201 (2021).
190. Slaveykova, V., Sonntag, B. & Gutiérrez, J. C. Stress and protists: no life without stress. *Eur. J. Protistol.* **55**, 39–49 (2016).
191. Khan, N. A. Life Cycle and Ecological Significance in *Acanthamoeba: biology and pathogenesis*. 70-73 (Caister Academic Press, 2009).

192. Vardi, A. et al. Programmed cell death of the dinoflagellate *Peridinium gatunense* is mediated by CO₂ limitation and oxidative stress. *Curr. Biol.* **9**, 1061–1064 (1999).
193. Frischkorn, K. R., Harke, M. J., Gobler, C. J. & Dyhrman, S. T. De novo assembly of *Aureococcus anophagefferens* transcriptomes reveals diverse responses to the low nutrient and low light conditions present during blooms. *Front. Microbiol.* **5**, 375 (2014).
194. Pelusi, A. et al. Virus-induced spore formation as a defense mechanism in marine diatoms. *New Phytol.* **229**, 2251–2259 (2021).
195. Frada, M. J. et al. Morphological switch to a resistant subpopulation in response to viral infection in the bloom-forming coccolithophore *Emiliana huxleyi*. *PLoS Pathog.* **13**, e1006775 (2017). **Show that the haploid phase of *E. huxleyi* is resistant to *E. huxleyi* viruses, unlike the diploid cell.**
196. De Vargas, C., Aubry, M. P., Probert, I. A. N., & Young, J. Origin and evolution of coccolithophores: from coastal hunters to oceanic farmers in *Evolution of Primary Producers in the Sea*. 251–285 (Academic Press, 2007).
197. Frada, M., Probert, I., Allen, M. J., Wilson, W. H. & de Vargas, C. The ‘Cheshire Cat’ escape strategy of the coccolithophore *Emiliana huxleyi* in response to viral infection. *PNAS* **105**, 15944–15949 (2008).
198. Zajac, A. J., Amphlett, E. M., Rowlands, D. J. & Sangar, D. V. Parameters influencing the attachment of Hepatitis A virus to a variety of continuous cell lines. *J. General Virol.* **72**, 1667–1675 (1991).
199. Stapleton, J. T., Frederick, J. & Meyer, B. Hepatitis A. Virus attachment to cultured cell lines. *J. Infect. Dis.* **164**, 1098–1103 (1991).
200. Cheshenko, N., Liu, W., Satlin, L. M. & Herold, B. C. Multiple receptor interactions trigger release of membrane and intracellular calcium stores critical for herpes simplex virus entry. *Mol. Biol. Cell* **18**, 3119–3130 (2007).
201. Bishop, N. E. & Anderson, D. A. Early interactions of Hepatitis A virus with cultured cells: viral elution and the effect of PH and calcium ions. *Arch Virol.* **142**, 2161–2178 (1997).
202. Wilson, W. H. et al. Isolation of viruses responsible for the demise of an *Emiliana huxleyi* bloom in the English. *Channel. J. Mar. Biol.* **82**, 369–377 (2002).
203. Bratbak, G., Egge, J. K. & Heldal, M. Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **93**, 39–48 (1993).
204. Evans, C., Malin, G., Mills, G. P. & Wilson, W. H. Viral infection of *Emiliana huxleyi* (Prymnesiophyceae) leads to elevated production of reactive oxygen species. *J. Phycol.* **42**, 1040–1047 (2006).
205. Mordecai, G. J., Verret, F., Highfield, A. & Schroeder, D. C. Schrödinger’s cheshire cat: are haploid *Emiliana huxleyi* cells resistant to viral infection or not? *Viruses* **9**, 51 (2017).
206. Silva, L. K., dos, S., Boratto, P. V. M., La Scola, B., Bonjardim, C. A. & Abrahão, J. S. *Acanthamoeba* and mimivirus interactions: the role of amoebal encystment and the expansion of the ‘Cheshire Cat’ theory. *Curr. Opin. Microbiol.* **31**, 9–15 (2016). **Highlights interactions between amoebae and giant viruses concerning encystment of the protist cells.**
207. Neff, R. J. S. A. R. W. F. B. & Wilborn, M. Induction of synchronous encystment (differentiation) in *Acanthamoeba sp.* *Methods Cell Biol.* **1**, 55–83 (1964).
208. Cordingley, J. S., Wills, R. A. & Villemez, C. L. Osmolarity is an independent trigger of *Acanthamoeba Castellanii* differentiation. *J. Cell Biochem.* **61**, 167–171 (1996).
209. Aksozek, A., McClellan, K. & Howard, K. Resistance of *Acanthamoeba Castellanii* cysts to physical, chemical, and radiological conditions. *J. Parasitol.* **88**, 621–623 (2002).
210. Moon, E. K., Chung, D., II, Hong, Y. C. & Kong, H. H. Characterization of a serine proteinase mediating encystation of *Acanthamoeba*. *Eukaryot Cell* **7**, 1513–1517 (2008).
211. La Scola, B. et al. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature* **455**, 100–104 (2008). **Describes a small virus, a virophage, that is associated with a new strain of mimivirus.**
212. Fischer, M. G. & Hackl, T. Host genome integration and giant virus-induced reactivation of the virophage mavirus. *Nature* **540**, 288–291 (2016).
213. Fischer, M. G. & Suttle, C. A. A virophage at the origin of large DNA transposons. *Science* **332**, 231–234 (2011).
214. Gaia, M. et al. Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity. *PLoS One* **9**, e94923 (2014).
215. Arthofer, P., Delafont, V., Willemsen, A., Panholz, F. & Horn, M. Defensive symbiosis against giant viruses in amoebae. *PNAS* **119**, e2205856119 (2022).
216. George, E. E. et al. A single cryptomonad cell harbors a complex community of organelles, bacteria, a phage, and selfish elements. *Curr. Biol.* **33**, 1982–1996.e4 (2023).
217. Javaux, E. J., Knoll, A. H. & Walter, M. R. Morphological and ecological complexity in early eukaryotic ecosystems. *Nature* **412**, 66–69 (2001).
218. Guglielmini, J., Woo, A. C., Krupovic, M., Forterre, P. & Gaia, M. Diversification of giant and large eukaryotic dsDNA viruses predated the origin of modern eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 19585–19592 (2019).
219. Arsenieff, L. et al. First viruses infecting the marine diatom *Guinardia delicatula*. *Front. Microbiol.* **10**, 3235 (2019).
220. Bidle, K. D., Haramaty, L., Barcelos Ramos, J. & Falkowski, P. Viral activation and recruitment of metacaspases in the unicellular coccolithophore, *Emiliana huxleyi*. *PNAS* **104**, 6049–6054 (2007).
221. Irwin, N. A. T., Pittis, A. A., Richards, T. A. & Keeling, P. J. Systematic evaluation of horizontal gene transfer between eukaryotes and viruses. *Nat. Microbiol.* **7**, 327–336 (2022). **Highlight the large number of horizontal gene transfer events that nucleocytoviruses have had mainly with protist hosts throughout natural history.**
222. Moliner, C., Fournier, P. E. & Raoult, D. Genome analysis of microorganisms living in amoebae reveals a melting pot of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 281–294 (2010).
223. Keeling, P. J. & Eglit, Y. Openly available illustrations as tools to describe eukaryotic microbial diversity. *PLoS Biol.* **21**, e3002395 (2023).
224. Mihara, T. et al. Linking virus genomes with host taxonomy. *Viruses* **8**, 66 (2016).
225. Tomaru, Y., Shirai, Y., Suzuki, H., Nagumo, T. & Nagasaki, K. Isolation and characterization of a new single-stranded DNA virus infecting the cosmopolitan marine diatom *Chaetoceros debilis*. *Aquatic Microbial Ecol.* **50**, 103–112 (2008).

Acknowledgements

We thank our colleagues from Laboratório de Vírus—UFMG for their technical support. We acknowledge financial support from Rede Vírus—Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI), Câmara Pox—405249/2022-5. We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), grant number 88882.348380/2010-1, Fundação de Amparo à Pesquisa do estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Programas Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia (INCT), grant number 406441/2022-7, chamada 58/2022, and Pró-Reitorias de Pesquisa e Pós-Graduação de UFMG, and the Centre for New Antibacterial Strategies (CANS) of the Arctic University of Norway (project ID #2520855). R.A.L.R. and J.S.A. are CNPq researchers.

Author contributions

V.F.Q., J.M.T. and B.B.B. performed the literature review and prepared the figures and tables. R.A.L.R., G.M.F.A. and J.S.A. designed the text structure and revised the manuscript. All authors contributed to the writing.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06001-2>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Gabriel Magno de Freitas Almeida.

Peer review information *Communications Biology* thanks Chuan Ku, Guifré Torruella and the other, anonymous, reviewer(s) for their contribution to the peer review of this work. Primary Handling Editor: Manuel Breuer. A peer review file is available.

Reprints and permissions information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2024

Review

Giant Viruses as a Source of Novel Enzymes for Biotechnological Application

Ellen Gonçalves de Oliveira ¹, João Victor Rodrigues Pessoa Carvalho ¹, Bruna Barbosa Botelho ¹, Clécio Alonso da Costa Filho ¹, Lethícia Ribeiro Henriques ^{1,2}, Bruna Luiza de Azevedo ¹ and Rodrigo Araújo Lima Rodrigues ^{1,*}

¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, MG, Brazil

² Núcleo de Apoio Técnico ao Ensino, Pesquisa e Extensão, Instituto de Ciências Ambientais, Químicas e Farmacêuticas, Universidade Federal de São Paulo, Diadema 09913-030, SP, Brazil

* Correspondence: ralr@ufmg.br

Abstract: The global demand for industrial enzymes has been increasing in recent years, and the search for new sources of these biological products is intense, especially in microorganisms. Most known viruses have limited genetic machinery and, thus, have been overlooked by the enzyme industry for years. However, a peculiar group of viruses breaks this paradigm. Giant viruses of the phylum *Nucleocytoviricota* infect protists (i.e., algae and amoebae) and have complex genomes, reaching up to 2.7 Mb in length and encoding hundreds of genes. Different giant viruses have robust metabolic machinery, especially those in the *Phycodnaviridae* and *Mimiviridae* families. In this review, we present some peculiarities of giant viruses that infect protists and discuss why they should be seen as an outstanding source of new enzymes. We revisited the genomes of representatives of different groups of giant viruses and put together information about their enzymatic machinery, highlighting several genes to be explored in biotechnology involved in carbohydrate metabolism, DNA replication, and RNA processing, among others. Finally, we present additional evidence based on structural biology using chitinase as a model to reinforce the role of giant viruses as a source of novel enzymes for biotechnological application.

Keywords: giant viruses; nucleocytoviricota; NCLDV; phycodnaviridae; mimiviridae; genomics; enzymes; biotechnology



Citation: de Oliveira, E.G.; Carvalho, J.V.R.P.; Botelho, B.B.; da Costa Filho, C.A.; Henriques, L.R.; de Azevedo, B.L.; Rodrigues, R.A.L. Giant Viruses as a Source of Novel Enzymes for Biotechnological Application. *Pathogens* **2022**, *11*, 1453. <https://doi.org/10.3390/pathogens11121453>

Academic Editor: Alessio Lorusso

Received: 28 October 2022

Accepted: 28 November 2022

Published: 1 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The global demand and trade of industrial enzymes are continuously growing, and they are estimated to reach \$7.0 billion USD in the next few years [1]. In this scenario, great importance is given to microbial enzymes, presenting several advantages, such as high yields, activity, and reproducibility, in addition to economic production, exponential growth, use of cheap platforms, and easy optimization. Many industrial processes demand enzymes, such as producing food, pharmaceutical products, detergents, and textiles. In this context, recombinant gene technology, protein engineering, and directed evolution have revolutionized enzyme manufacturing and this industry. Enzymes with a hydrolytic activity are used in the degradation processes of various natural substances and are extensively applied in industry. Proteases, essential enzymes for the detergent and dairy industries, are also widely used. Those enrolled in carbohydrate metabolism, including amylases and cellulases, are extensively used in the textile, detergent, and food industries [2]. Approximately 60% of industrial enzymes come from fungi, 24% from bacteria, 4% from yeasts, and most of the 12% remaining are obtained from plants and animals [1,2]. However, although viruses represent a small portion of these enzymes, studies about their potential have been growing in the last 30 years (Figure 1). They have a complex geometric structure and highly

efficient genetic machinery, and, beyond that, they are sources of unique enzymes with great biotechnological potential [3].

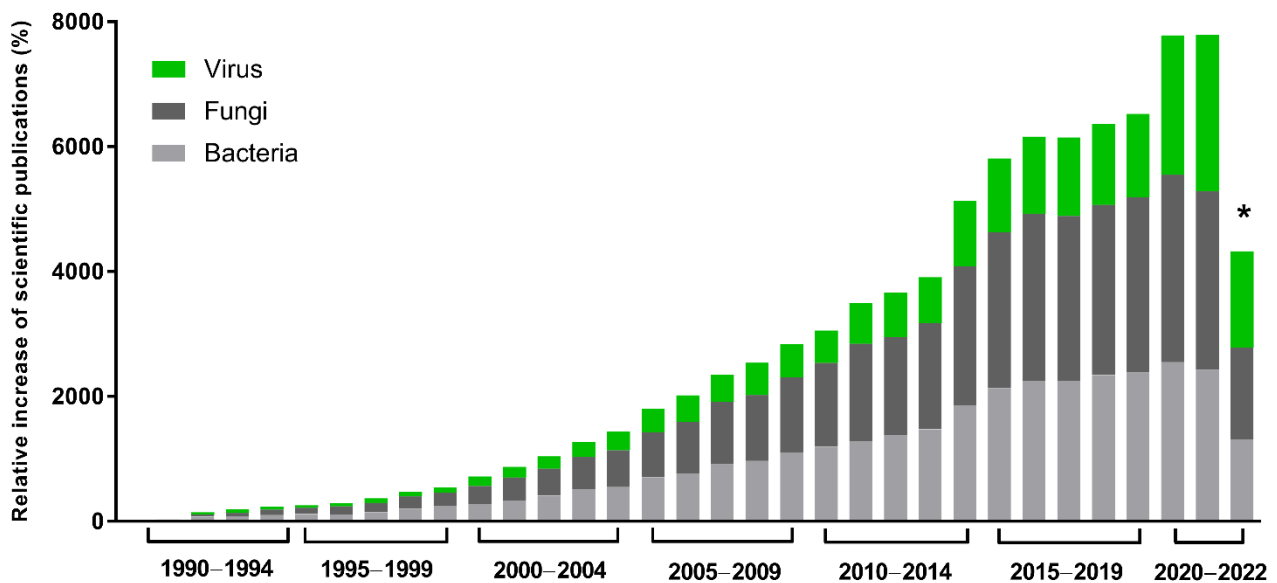


Figure 1. Scientific interest in microbial enzymes in biotechnology. Relative increase in scientific publications since 1990. The numbers were obtained from the Pubmed database using the names of the microbial groups (viruses, fungi, or bacteria), plus enzymes plus biotechnology. A total of 112,240 results were obtained. Relative increase was calculated by comparing the number of publications in a given year with the publication number in 1990, the first year of the historical record. * Data as of 12 September 2022.

The discovery of reverse transcriptase in retroviruses by David Baltimore and Howard Temin in 1970 was a milestone for molecular and cancer biology and started our understanding about retrovirology [4]. Other viruses that have been exploited for biotechnology are bacteriophages, since they are easy to manipulate and have interesting enzymes for several applications, such as DNA polymerases, DNA ligases, and lytic enzymes [2,5]. These lytic enzymes have enormous potential for use as antimicrobials because they exhibit bactericidal effects, absence of resistance, and activity against persistent cells. These enzymes degrade peptidoglycans, have antimicrobial and anti-biofilm properties (e.g., endolysins), and can be applied in treatments of bacterial infections [5,6].

The concept that viruses carry only genes that support their viral replication and capsid production changed with the discovery of giant viruses, opening space for a new approach and understanding of their contribution to the evolution of life [7]. Differently from the other viral groups and, similarly to bacteria and prokaryotes, they carry large genomes, with a diversity of genes capable of coding for numerous proteins, including DNA repair and even metabolic enzymes [7,8]. This new approach to understanding not only enriches the primary refinement regarding these viruses and their hosts, but also the beginning of the potential of these organisms for several biotechnological purposes. These viruses were first discovered in the 1970s, infecting unicellular algae, and many different isolates have been identified since then [9–11]. With the discovery of mimiviruses in the early 2000s and other giant amoeba viruses in the following years, the group of so-called nucleocytoplasmic large DNA viruses (NCLDV), currently classified in the phylum *Nucleocytoviricota*, greatly expanded, and pushed forward the boundaries of the virosphere [12–14].

Genomic studies of giant viruses of protists raised many questions about their biology, ecology, origin, and evolution. In addition, the surprising amount of genes harbored by these viruses, with a considerable number of them encoding enzymes used as valuable tools in different sectors of the economy, open a new venue for important novelties originated from viruses to be explored and applied in the biotechnology field [15–17]. In this review,

we explore the diversity of giant viruses of protists, focusing on their genomic complexity, and highlighting how known genes previously described can be valuable sources of novel enzymes for biotechnological applications.

2. *Phycodnaviridae*: The First Family of Giant Viruses of Protists

The *Phycodnaviridae* family includes viruses with biochemical and genetic peculiarities, such as DNA error correction and post-replicative processing, that infect eukaryotic algae from freshwater or marine environments [18,19]. Phylogenetic analysis using DNA polymerase B sequences from members of this family showed that they have a common ancestor with other NCLDV, thus corroborating their classification in the phylum *Nucleocytoviricota* [14]. The family currently comprises six genera named *Coccolithovirus*, *Phaeovirus*, *Prasinovirus*, *Raphidovirus*, *Prymnesiovirus*, and *Chlorovirus*, that differ in terms of cycle type, host, genome topology, and gene content [20,21].

Although genes enrolled in lipid metabolism are not the most abundant functional category in giant viruses, they are strongly present in coccolithoviruses (Figure 2). Coccolithoviruses infect microalgae of the species *Emiliana huxleyi*, commonly found in marine sediments. *Emiliana huxleyi* virus 86 (EhV-86), one of the first known coccolithoviruses, was observed in 1999, having a viral particle around 200 nm, covered by a lipid membrane and a linear genome of 407 kbp [22]. Curiously, a genomic characterization of the EhV-86 identified 472 coding sequencing (CDS) regions, but only 63 genes have a known function so far (Table 1). An amount of 10% of them encode enzymes involved in the biosynthesis of sphingolipids: sterol desaturase, serine palmitoyltransferase, lipid phosphate phosphatase, and two genes encoding desaturases (Figure 2; Table S1).

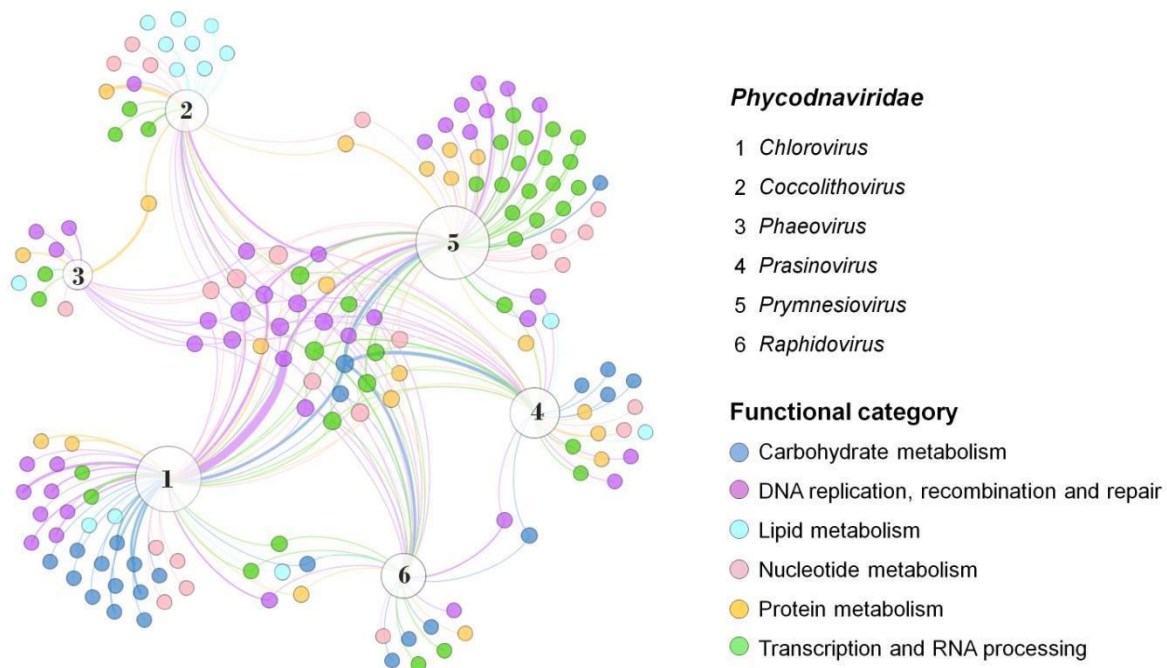


Figure 2. Presence and distribution of enzymes in the *Phycodnaviridae* family. Representatives of each genus were included and data on the diversity and abundance of enzymes grouped into different functional categories were obtained from genomic annotations publicly available on GenBank. A network graph was constructed using Gephi 0.9.7 using a force-based algorithm (ForceAtlas2), followed by a manual arrangement of nodes for better visualization. Node sizes are proportional to the degree of connection. The thickness of the edges is proportional to the number of genes of the same function in the genome of a virus. Virus representatives: (1) *Paramecium bursaria chlorovirus* 1; (2) *Emiliana huxleyi* virus 86; (3) *Feldmannia* species virus; (4) *Ostreococcus tauri* virus 5; (5) *Phaeocystis globosa* virus; (6) *Heterosigma akashiwo* virus 01. Full data are available in Table S1.

Table 1. General genomic data of representatives of different groups of giant viruses of protists.

Family *	Genus *	Virus	Genome Length (bp)	GC%	CDS	Unclassified CDS #	NCBI Accession	
<i>Phycodnaviridae</i>	<i>Chlorovirus</i>	Paramecium bursaria Chlorella virus 1	330,611	40.0	416	368	NC_000852.5	
		Only Syngen Nebraska virus 5	327,147	42.4	357	204	NC_032001.1	
		PBCV CVB-1	319,457	44.3	339	214	JX997160	
		Acanthocystis turfacea chlorella virus 1	288,047	49.4	329	218	NC_008724.1	
	<i>Coccolithovirus</i>	<i>Prasinovirus</i>	Emiliana huxleyi virus 86	407,339	40.2	472	409	AJ890364.1
			Micromonas pusilla virus SP1	173,451	40.6	242	220	NC_043129.1
	<i>Raphidovirus</i>	<i>Prymnesioiviridae</i>	Ostreococcus tauri virus OtV5	186,713	44.8	268	208	NC_010191.2
			Heterosigma akashiwo virus 01	274,793	30.4	246	190	NC_038553.1
	<i>Phaeovirus</i>	<i>Phaeovirus</i>	Chrysochromulina parva virus	437,255	25.1	45	28	MH918795.1
			Feldmannia species virus	154,641	51.8	150	110	NC_011183.1
<i>Mimiviridae</i>	<i>Mimivirus</i>	Acanthamoeba polyphaga mimivirus	1,181,549	27.9	985	537	HQ336222.2	
		Moumouvirus australiensis	1,098,000	25.1	899	438	MG807320.1	
		Megavirus chilensis	1,246,130	25.3	1126	610	NC_016072.1	
	<i>Tupanvirus</i>	<i>Tupanvirus</i>	Tupanvirus soda lake	1,516,267	29.0	1359	914	KY523104.2
			Tupanvirus deep ocean	1,439,510	29.4	1276	845	MF405918.2
	<i>Cafeteriavirus</i>	<i>Cafeteriavirus</i>	Cafeteria roenbergensis virus	617,453	23.3	544	376	NC_014637.1
			Chlorella virus XW01	407,612	21.9	200	90	OL828820.1
	<i>Klosneuvirus</i>	<i>Klosneuvirus</i>	Klosneuvirus	1,573,080	28.6	1545	1017	KY684108.1
			Fadolivirus	1,573,504	27.1	1428	674	MT418680.1
			Yasminevirus	1,991,922	40.4	1434	926	UPSH01000001.1
	<i>Mesomimivirus</i>	<i>Mesomimivirus</i>	Bodo saltans virus	1,385,870	25.3	1207	683	MF782455.1
			Tetraselmis virus 1	668,031	41.2	653	461	KY322437.1
			Aureococcus anophagefferens virus	370,920	28.9	384	309	OM876856.1
	<i>Marseilleviridae</i>	<i>Marseillevirus</i>	Marseillevirus T19	368,454	44.7	428	273	NC_013756.1
			Noumeavirus	376,207	42.9	452	300	NC_033775.1
Tunisvirus			380,011	43.0	484	355	NC_038511.1	
Brazilian Marseillevirus			362,276	43.3	491	347	NC_029692.1	
<i>Pithoviridae</i>	<i>Pithovirus</i> <i>Cedratovirus</i>	Pithovirus sibericum	610,033	35.8	467	339	NC_023423.1	
		Cedratvirus A11	589,068	42.7	574	330	NC_032108.1	
		Brazilian cedratvirus	460,038	42.9	533	325	LT994651.1	
<i>Orpheoviridae</i>	<i>Orpheovirus</i>	Orpheovirus IHUMI	1,473,573	25.0	1199	753	NC_036594.1	
<i>Pandoraviridae</i>	<i>Pandoravirus</i>	Pandoravirus salinus	2,476,870	61.7	1430	853	NC_022098.1	
		Pandoravirus dulcis	1,908,520	63.7	1070	748	NC_021858.1	
		Pandoravirus massiliensis	1,593,060	60.1	1269	1003	MZ384240.1	
		Pandoravirus neocaledonia	2,003,190	60.6	1081	709	NC_037666.1	
<i>Molliviridae</i>	<i>Mollivirus</i>	Mollivirus sibericum	651,523	60.1	523	424	NC_027867.1	
		Mollivirus kamchatka	648,864	60.1	504	428	MN812837.1	
<i>Medusaviridae</i>		Acanthamoeba castellanii medusavirus	381,277	61.7	470	358	AP018495.1	
<i>Faustoviridae</i>	<i>Faustovirus</i>	Faustovirus E12	466,265	36.2	492	404	KJ614390.1	
		Faustovirus D3	465,956	37.7	485	423	KU556803.1	
	<i>Pacmanvirus</i> <i>Kaumoebavirus</i>	<i>Pacmanvirus</i> <i>Kaumoebavirus</i>	Pacman A23	395,405	33.6	465	362	LT706986.1
			Kaumoebavirus Sc	350,731	43.7	429	391	NC_034249.1

* Only italicized taxa are currently defined by ICTV. # Genes with unknown functions based on NCVOG functional categories.

Such enzymes are involved in the synthesis of ceramide, which induces apoptosis of the infected cell [23]. Although the mechanism of apoptosis has already been observed in other viruses, no genes related to the synthesis of sphingolipids were found in their genomes, making these genes exclusive to coccolithoviruses [24–26]. In addition, a proteome analysis showed that these enzymes enrolled in sphingolipid biosynthesis are present as early-class proteins, suggesting that they could be functional and also play an important role in initial infection [27]. Besides that, this highlights that these genes are not only carried inside the viral particles, but that they are also translated into functional proteins in the host and can be explored as biotechnological enzymes. Sphingolipids are molecules found in eukaryotes and prokaryotes and perform structural, signaling, and biochemical functions. They have been mentioned as a potent food supplement, and as a cosmetic, as they prevent skin infection and inhibit bacteria and fungi proliferation [28,29].

A comparative study performed by Nissimov and colleagues showed the presence of 25 to 29 CDS from other isolated viruses (EhV-201, EhV-207, and EhV-208) identical

to sequences present in the EhV-86 genome. The predicted enzymes found were methyltransferases, glycosyltransferases, and RNase, and the majority of non-shared proteins, considered hypothetical ones, have unknown functions. On the other hand, the EhV-84 isolate showed many proteins (231 CDS) with identical homology with EhV-86 proteins [30]. With a few available genomes, it is clear that there is a vast field to be explored, both for obtaining more information about the viruses' biology and ecology, and to be investigated for biotechnological purposes.

Phaeoviruses infect filamentous algae, most from the genus *Ectocarpus* and *Feldmania*, in subtropical environments, and they are the only phycodnaviruses known so far to infect more than one host. Genomic analysis of the *Ectocarpus siliculosus* virus-1 (EsV-1) revealed 231 CDS regions, where only 50% had determined functional characterization. Among these include genes involved in DNA synthesis, polysaccharide metabolism, histidine protein kinases, integration, and transposition [31]. Integrases catalyze site-specific DNA rearrangement, and transposases can bind in transposons on DNA and move small fragments along the genome. Both enzymes can be used for gene editing, gene therapy, and integrases are also studied as resistant markers [32,33]. A close relative is the *Feldmania* species virus (FsV), a phaeovirus associated with the brown filamentous algae *Feldmania* sp. This virus was considered the smallest giant viruses with a linear genome of 154 kbp and 150 CDS regions, of which only 25% had similarity with the database, such as those enrolled on DNA replication, transcription, nucleotide metabolism, and also lipid and protein metabolisms (Figures 2 and 3) [34].

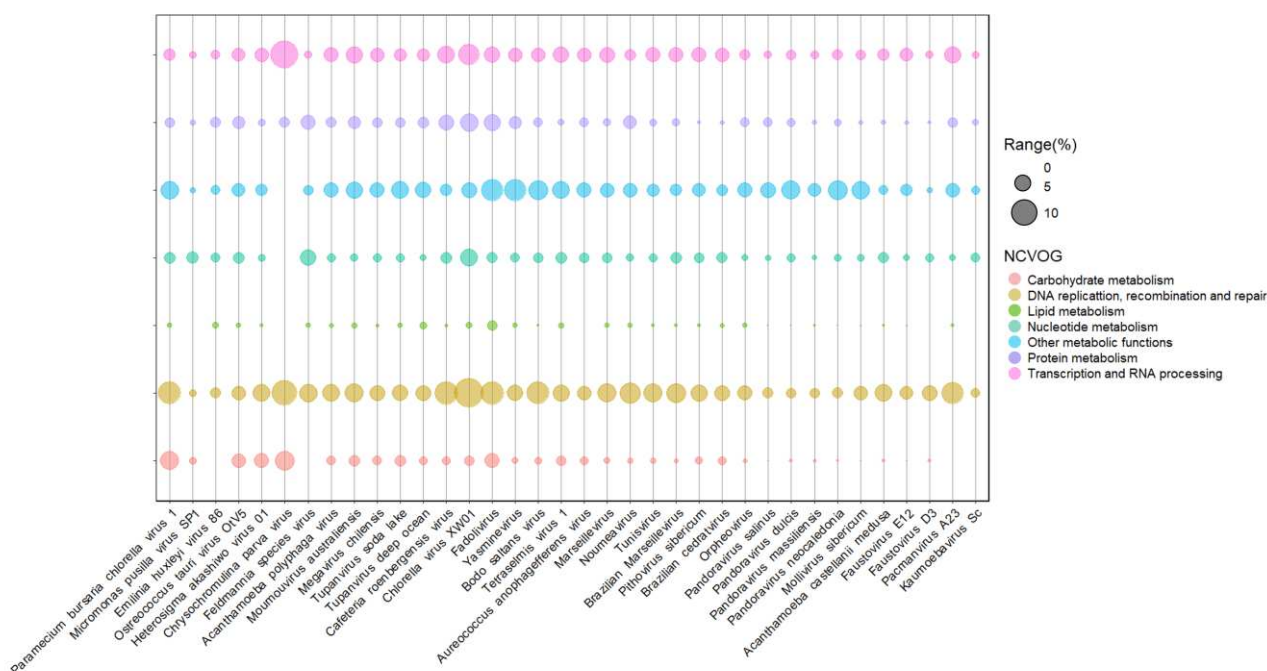


Figure 3. Presence and abundance of enzymes in giant viruses of protists. Bubble chart containing representatives of different viral families of the phylum nucleocytoviricota associated with algal and amoeba hosts. Bubble sizes are proportional to the number of enzymes represented as a gene percentage of a functional category in the virus genome. Data on enzyme diversity and abundance of each virus grouped into different functional categories were obtained from genomic annotations publicly available on GenBank and classified according to NCVOG categories.

Prasinoviruses infect prasinophytes, considered the smallest free-living photosynthetic eukaryotes [35]. Genomic analysis of the *Osteococcus tauri* virus (OtV-1) showed 232 CDS regions, where 31% showed functional similarity with previously described proteins, including methyltransferases and other enzymes involved in DNA, protein, and carbohydrate metabolism [33]. The *Osteococcus tauri* virus OtV-5 genome has 268 CDSs, and only 57% of

the predicted proteins had a known function, including those involved in DNA replication and viral particle formation. Interestingly, some host-related genes were also found, including a proline dehydrogenase, related to cellular oxidation protective metabolism [36,37]. This virus has complex glycosylation machinery, with at least five glycosyltransferases and a galactosyltransferase, indicating relative independence of the host for glycosylating their own proteins (Figure 2; Table S1). It's worth noting that other giant viruses also have glycosylation machinery, with many proteins involved in carbohydrate modification and sugar production, which could be explored in the biotechnology industry [38,39].

Rhaphidoviruses have a wide variety of hosts. Among them is the single-celled seaweed bloom-forming *Heterosigma akashiwo*, which can form surface aggregations toxic to the environment [40]. The complete sequencing of the first virus strain infecting this alga (HaV53) was published in 2016, and genes related to DNA regulation, carbohydrate metabolism, signal transduction, and regulation of ubiquitin-related proteins were found. However, there is still a limited characterization of this genome [41]. Similar to other members of the *Phycodnaviridae* family, HaV01 has known glycosyltransferases that might be involved in viral protein glycosylation. In addition, proteins involved in transcription and RNA processing have also been identified, including a ribonuclease III and a mRNA-capping enzyme (Figure 2; Table S1). Ribonuclease III can cleave double-strand RNA (dsRNA), an essential step in the maturation and decay of coding and non-coding RNAs. The first characterized ribonuclease III was from *Escherichia coli*, which is commercially available, and the enzyme is also present and well-conserved in plants, animals, fungi, and eukaryotic viruses [42]. The mRNA-capping enzyme is a complex that promotes the first modification of RNA polymerase II transcripts. In this context, this complex can regulate cap-dependent protein synthesis and act in the protein export mechanism [43]. Many types of mRNA-capping systems have also been described in viruses, such as influenza, orthomyxoviruses, alphaviruses, mimiviruses, and chloroviruses [43,44]. It is interesting to note that New England Biolabs Inc. has recently announced that the Faustovirus capping enzyme is commercially available, an enzyme that demonstrates increased capping efficiency across a variety of mRNA 5' structures than previous enzymes [45].

Prymnesioviruses infect phytoplankton algae with high biomass formation, such as *Phaeocystis globosa*. Genomic analysis of the strain *Phaetocistis globosa* virus-16T (PgV-16T) showed 434 CDS regions with no phylogenetic proximity with the other viruses that infect algae, even though they are part of the Megaviridae clade. Seventy percent of its genome is similar to other large double-stranded DNA (dsDNA) viruses, with genes related to many processes, such as DNA replication and repair, including methyltransferases and transposases [46]. Seven coded genes seem unique in their genome among the group, which encode peculiar enzymes, such as phospholipase and asparagine synthetase homologs [46]. Phospholipases are responsible for hydrolyzing phospholipids into other lipids and are widely used in industrial food processes, while asparagine synthetase is a target related to the growth of human tumor cells. These prokaryote enzymes have also been characterized [47,48]. Compared to other phycodnaviruses, the difference between PgV-16T and these viruses' genetic profile is clear, considering the functional clusters of genes (Figure 2). Such a difference corroborates previous data, pointing to this virus as a member of the *Mimiviridae* family [46]. Another member of this group is the *Chrysochromulina brevilum* virus PW1, the only recognized species by ICTV so far [20]. A few viruses infecting *Chrysochromulina* sp. have been identified in the last years, and genome analysis of *C. parva* viruses suggested limited gene machinery compared to other phycodnaviruses (Figure 3).

The last-mentioned genus, *Chlorovirus*, was the first to be created, comprising the first virus associated with chlorella-like green algae, back in the late 1970s [49,50]. The first reported phycodnavirus, zoochlorella cell virus (ZCV), was isolated in the late 1970s in Japan from a *Chlorella* sp. that lives in symbiosis with the protozoan *Paramecium bursaria*. The ZCV was able to infect only zoochlorella recently separated from its symbiotic protozoan [9]. A few years later, viruses sharing many characteristics with ZCV were isolated from zoochlorella associated with *Hydra viridis* (HVCV-1 and HVCV-2) and also

with *Paramecium bursaria* (PBCV-1), which would become the most studied algae viruses over the last decades [10,49,50]. Given the importance of chloroviruses for the field, we will cover the main genomic features of these viruses separately.

3. Chloroviruses: Large Viruses with Giant and Complex Genomes

Representatives of the *Chlorovirus* genus have a complex linear genome ranging from 290 kb to 370 kb and containing 315 to 415 protein-coding sequences. Approximately fifty percent of their CDS have no known function, and some have never been observed in other viral genomes [21].

A high tropism observed between chloroviruses and chlorella cells is probably related to the viral interaction with the host's cell wall, a thick and rigid structure that varies according to the alga species [51]. The chloroviruses isolated from *Chlorella variabilis* NC64A are the NC64A viruses; those that infect *Chlorella heliozoae* SAG 3.83 are the SAG viruses, and the Pbi viruses have the alga *Micractinium conductrix* Pbi as an in vitro host. Those that replicate in vitro exclusively in *Chlorella variabilis* Syngen 2-3 are named Osy viruses [52].

Gene organization is relatively conserved within the same clade, even though synteny is not well conserved in chloroviruses. Genes related to the initial and final phases of the infection are dispersed throughout the genome, but gene clusters are observed as “gene gangs” [21,53]. There are groups of orthologous genes (COGs), specific for each of the three main host-related chlorovirus clades (NC64A, Pbi, and SAG), which suggests that these genes may encode proteins related to tropism and recognition of cellular receptors of the microalgae host [54].

The 331 kb genome of PBCV-1, the study model of chloroviruses, has repeated inversions covalently linked that form hairpins at the far ends [55]. The approximately 130 protein-coding sequences common to all members of the genus constitute the core genome, composed of just over 45% of coding sequences related to proteins with known functions [54,56]. These proteins are related to viral multiplication and essential functions common to all chloroviruses, such as viral DNA replication, virion structure, and host cell wall degradation [54]. Intronic regions (up to three types of introns) have also been identified in the chlorovirus genome, and some are highly conserved within the genus [11]. Viral DNA has methylated bases that occur at highly variable frequencies, even comparing genomes of the same viral species, and it is resistant to degradation by endonucleases [19].

Enzymes with unique characteristics have been previously found in chloroviruses and are commercially available as biotechnological products. The PBCV-1 DNA ligase (SplintR Ligase), considered the smallest known functional ligase, can establish a high-efficiency binding between a DNA molecule and a target RNA molecule, allowing the construction of RNAseq libraries and microRNA studies [57,58]. The CvIAII endonuclease was identified in the 1990s, and this enzyme cleaves DNA at the specific C/ATG site and is not affected by mATG methylation. Both enzymes are produced exclusively by these viruses and are commercially available by New England BioLabs Inc. [59]. Furthermore, chloroviruses are rich in methyltransferase systems and have exclusive enzymes involved in carbohydrate metabolism, which give these organisms a unique biotechnological potential [60–63].

Chloroviruses have many genes encoding enzymes of carbohydrate metabolism (Figure 2; Table S1). In PBCV-1, UDP-glucose dehydrogenase (UDP-GlcDH), fructose-6-phosphate-aminotransferase, and hyaluronan synthase were identified, and their transcripts observed in the initial phase of infection in *Chlorella* sp. [60,61]. These genes are involved in the synthesis of hyaluronan, a polysaccharide produced in the dense host cell, forming a fiber network [64]. Hyaluronan or hyaluronic acid is a polymer of repeated units of β -1,4-D-glucuronic acid and β -1,3-N-acetyl-D-glucosamine, a component of extracellular matrices in mammals [65]. It is applied in several areas of the biotechnology industry, from immunomodulation and tissue regeneration to the production of nutraceutical cosmetics [66–68]. The *has* gene codes for hyaluronan synthase and is found in only 30% of chloroviruses. This gene does not appear to be essential for viral replication, either in the laboratory or under natural conditions [11,64]. However, it was demonstrated that the pro-

duction of hyaluronan in extracellular matrix of chlorella after infection with chloroviruses is observed. Although the role of polysaccharide production by infected cells, and why chloroviruses carry these genes is still unclear, one can consider that these carbohydrates play essential roles in their multiplication cycle [11].

Other essential enzymes are chitinases, chitosanases, β -1,3 glucanase, and alginate lyases, which seem to participate in the degradation of host cell wall polysaccharides, apparently associated with initial infection [69]. Although chitin is not commonly present in the cell wall of green algae, it was found in algae after Pbi or CVK-2 chloroviruses infection, suggesting that its synthesis was likely a result of chloroviruses infection [70,71]. Thus, despite the mechanism by which the synthesis and degradation of these carbohydrates occur in these organisms is not yet elucidated, the host–virus interaction is essential to produce these proteins.

Chitinases catalyze chitin hydrolysis reaction, while chitosanases act the same way on chitosan, producing molecules with lower molecular weight used in the production of polymers and biofilms and biological controls [72–74]. In agriculture, the inhibitory properties of chitinases have been used for the biological control of plant pests and fungal diseases [75,76]. They are also used for biomass degradation of chitin into chitoooligosaccharides (COS), chitosan, and other chitin derivatives up to the production of soluble monomers that can be used in the food industry [73,77,78]. In the same way, oligosaccharides resulting from chitin degradation have also demonstrated antitumor and anti-inflammatory potential [79,80].

Interestingly, chitinase of PBCV-1 (*Phycodnaviridae*), Tupanvirus (*Mimiviridae*), and *Bacillus cereus* (Bacteria/Bacillaceae) share a conserved sequence D/SI/LDWEY, which could correspond to the aspartate and glutamic acid catalytic residues in common chitinases (e.g., D209 and E211 in PDB ID: 6BT9), even with an evident difference in the size of the proteins (Figure 4, Table S2). Target sequences were also modeled with RoseTTAFold, presenting similar results to SWISS-MODEL predictions, showing an equivalent core for all structures, evident differences in size, and also two lateral protein fragments for *B. cereus*, one for Tupanvirus, and being absent in PBCV-1 (Figure S1, Table S2). Chitinase of *B. cereus* has been studied as a promising molecule for biological control with a potential antifungal activity [81]. The similarity found in the catalytic domain of the three proteins' structure is additional evidence that giant viruses can share functional enzymes with prokaryotes and reinforces that, as well as bacteria (which represent one of the most representative groups for enzymes with biotechnological potential), they can also be regarded as a rich source of functional enzymes. Corroborating our data, a recent study also demonstrates that chitinase encoded by a virus genome is active, as well as bacteria showing the insecticidal effect [82].

Another complex machinery is the addition and removal of carbohydrates, a process called glycosylation, which promotes the modification of proteins that can be connected to the cell, including the conversion of signal transmission, molecular signal, and endocytosis, key events that confer structural diversity among organisms [83,84]. The PBCV-1 genome has glycosyltransferases, GDP-d-mannose dehydratase (GMD), and GDP-4-keto-6-deoxy-d-mannose epimerase/reductase (GMER) enzymes. These are enrolled in the glycosylation process, synthesizing the sugar residues fucose, rhamnose, and glycans, constituents of the main capsid protein Vp54 [83,85,86]. They are highly conserved enzymes distributed in cellular organisms, involved in the formation of GDP-L-fucose in bacteria, plants, and animals [85–89].

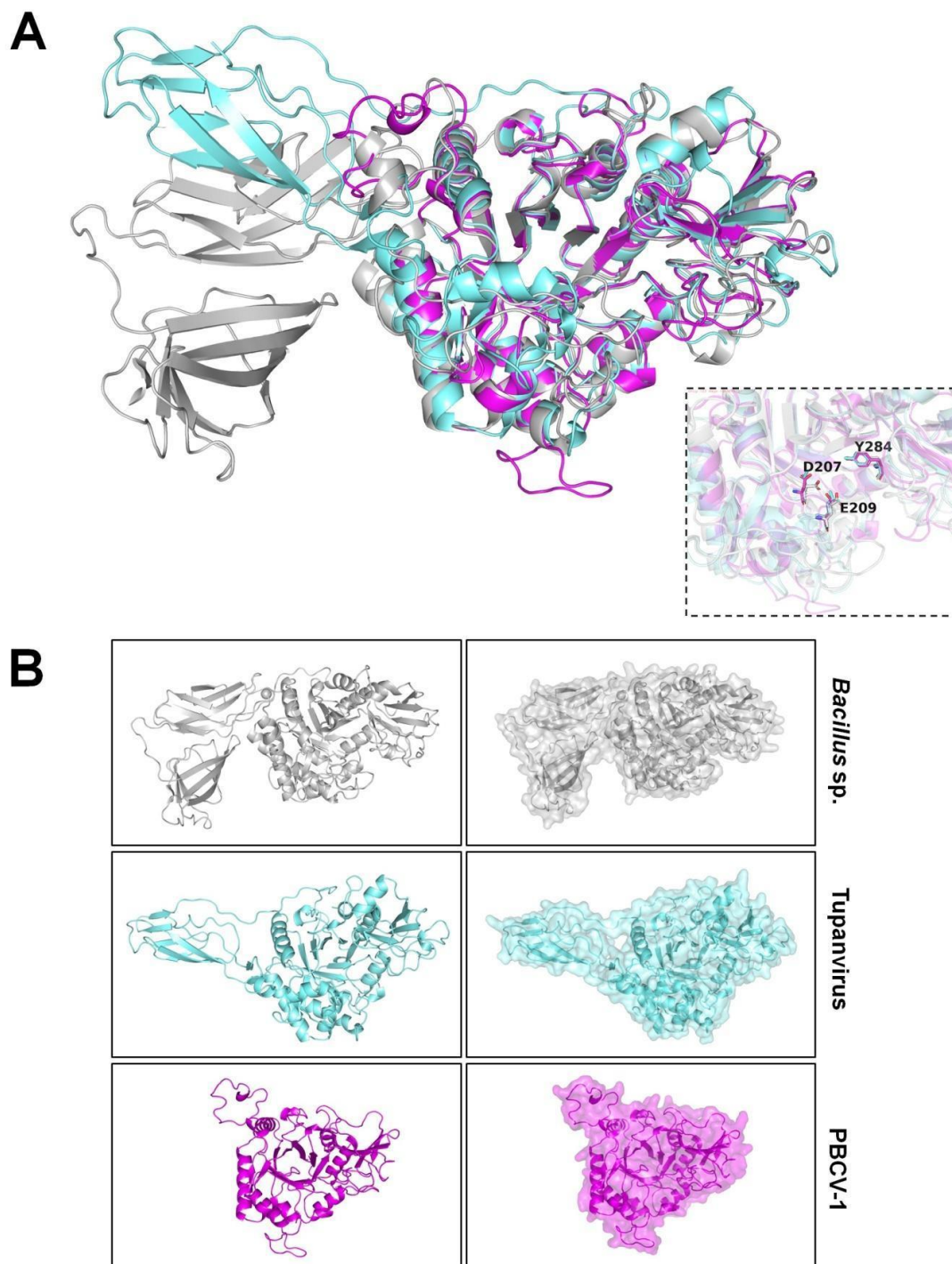


Figure 4. Models of chitinases from microbial sources. Modeled structures were obtained by SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/> (accessed on 1 October 2022)), represented by drawing. **(A)** Three-dimensional alignment of chitinases from *Bacillus cereus*/Bacteria (gray), Tupanvirus/*Mimiviridae* (cyan), and *Paramecium bursaria chlorella virus 1/Phycodnaviridae* (pink). The alignment shows an equivalent core for all structures, with an evident difference in size, especially from *B. cereus*, with two-sided protein fragments, one being correspondent to Tupanvirus and absent in PBCV-1. The box in the right part of the image evidences key common residues at the active site of the enzymes (D207, E209, Y284); **(B)** Models from each microorganism represented as drawing and surface structures. The modeling of each target sequence was assessed with the best hit available (scored) after employing the search template and build model tools. Model alignment and analysis were assessed with the PyMOL software (v0.99c).

Glycosyltransferases can transfer sugars for different biomolecules, such as lipids and peptides. They play an essential role and have been studied as a tool to develop new drugs, vaccines, and therapeutics [90]. They also can be used to convert and obtain glycosides with biological interest, such as a rapid conversion of sucrose and uridine 5'-diphosphate (UDP) into UDP-glucose at large scale in different organisms [91,92]. Another essential function is the post-translational modification in proteins, recognized as N-glycosylation, which is found in many biopharmaceutical proteins and can influence their solubility, functionality, and other properties. In this context, modifications in the N-glycosylation process can be achieved to obtain products with different characteristics [93]. Altogether, chloroviruses and other phycodnaviruses have several genes to be further structurally and functionally characterized, which could bring exciting and innovative biotechnology tools. After the discovery and expansion of the viruses infecting photosynthetic protists, new viruses were identified through infecting free-living amoebae. Another group of protists that have been hiding in plain sight are a valuable source of giant and complex viruses [94].

4. Giant Viruses of Amoebae: Expanding the Complexity of the Virosphere

The algae-infecting *Phycodnaviridae* were the first family of viruses referred to as giants [95]. However, discussion and further studies of giant viruses greatly intensified with the discovery of *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) in 2003, a virus that can infect free-living amoebae of the *Acanthamoeba* genus [12]. Mimiviruses form a broad and diverse family of viruses belonging to the phylum *Nucleocytoviricota*. According to the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV), the *Mimiviridae* family is currently composed of two recognized genera: *Cafeteriavirus* and *Mimivirus*, whose main representative members are *Cafeteria roenbergensis* virus (CroV) and APMV, respectively [20]. CroV is known to infect a marine heterotrophic unicellular protist named *Cafeteria roenbergensis* and has a genome of 730 kbp [96]. On the other hand, APMV harboring its 1.2 megabase pairs (Mbp) genome is known to use amoebae from the *Acanthamoeba* genus as hosts, at least in laboratory conditions (Table 1) [12]. Although ICTV currently classifies only a couple of taxonomic groups belonging to the *Mimiviridae* family, several other putative members of this family have been described in the last years. Many isolates have already been identified in environmental water samples in different countries in Oceania, Europe, Asia, Africa, and South America [97–101]. APMV is the main representative member of lineage A, whereas moulouviruses represent lineage B, and megaviruses represent lineage C [102–104].

The discovery of these viruses greatly impacted the virology field due to the particles and genome sizes of mimiviruses composed of unique gene machinery. In general, mimiviruses' dsDNA molecules code for genes never described for any virus before. This set of genes includes some related to protein translation and DNA repair processes, as well as chaperones and genes involved in different enzymatic pathways [13,105]. The mimiviruses translation-related genes set includes many aminoacyl-tRNA synthetases, transfer RNAs (tRNAs), and translation factors [105–107]. AARSs can establish a covalent ligation between an amino acid and its cognation tRNA and are important for metabolic and signaling pathways. In that way, because they are enrolled in protein translation, in biotechnology they are important to study protein regulation and are also an interesting target for drug discoveries [108,109]. In addition, the category of enzymatic pathways-related genes comprises enzymes involved in amino acid and lipid synthesis, sugar metabolism, and protein glycosylation, similar to that described for phycodnaviruses. APMV, for example, codes for at least six classes of glycosyltransferases that might be involved in the glycosylation process of its major capsid protein (MCP) and its fibrils' glycoproteins [105,110].

Besides the three lineages, more divergent members of the *Mimiviridae* family were also described recently. The tupanviruses are intriguing giant viruses isolated from extreme environments in Brazil, having a capsid-associated long tail, which enables the formation of gigantic particles (~2.3 µm) [111]. Tupanviruses also drew attention because of the complexity of their genomes. These viruses have the most complete protein translation apparatus

of the virosphere to date, which includes up to 70 types of tRNAs, and factors related to tRNA maturation and stabilization besides all the 20 aminoacyl-tRNA synthetases [111]. Interestingly, a peculiarity of tupanviruses is that they code for citrate synthase, an enzyme involved in the metabolic pathway of energy production [112]. This enzyme is essential for starting the tricarboxylic acid cycle in eukaryotes and prokaryotes, which is an important key for cell energy production [113]. It has been used in the biotechnology industry to measure pyruvate carboxylase activity by enzymatic assay tests and also as a mitochondrial biomarker in cells [114]). Additionally, tupanviruses encode a mannose-specific lectin gene, which seems to be related to the amoeba-bunch formation, a specific cytopathic effect caused by these viruses in amoebas [115]. In general, lectins bind to different carbohydrates, and some recent studies have shown their potential biotechnological roles, such as the purification of biomolecules and insecticide action [116]. Tupanviruses, as well as mimiviruses, have complex and quasi-autonomous glycosylation machinery [38,39]. These viruses have many enzymes involved in carbohydrate metabolism, including glycosyltransferases, glucose-methanol-choline oxidoreductases, and UDP-glucose 4 epimerase, among others, accounting for 3% of viral genomes (Figure 3). Curiously, Tupanvirus soda lake has a chitinase coded in its genome, which is homologous to a chitinase found in chloroviruses (Figure 4). Both viral enzymes have structural similarities with a chitinase from *Bacillus cereus* (a microbial source of industrial enzymes), including specific residues at the enzyme active site (Figure 4). The biological activity of this protein remains to be characterized, but evidence points to these viruses as promising sources of new active enzymes.

Some mimiviruses that infect algae can also have exclusive and intriguing genes. Tetraselmis virus (TetV-1), a mimivirus that infects green algae, is the only virus of the family having fermentation genes, such as those enrolled in pyruvate metabolism, pyruvate formate-lyase, pyruvate formate-lyase activating enzyme, mannitol metabolism, and mannitol 1-phosphate dehydrogenase. They also have alpha-galactosidases, genes enrolled in sugar degradation [117]. Fermentation enzymes are related to glycolysis anaerobic metabolism and are commonly found in bacteria. Because of them, these organisms are widely used in industry to produce ethanol, food, and medicines [118]. Numerous genes encoding enzymes enrolled on triacylglycerol degradation were also found in Pymnesium kappa virus RF01 (PkV RF01), which also infects algae [8,119]. Lipase enzymes catalyze the hydrolysis of triglycerides to glycerol and fatty acids. These enzymes have potential applications in oil, food, biodiesel production, and many other industries. Recently, they have been studied as a potent tool to nutritionally enrich vegetable oils or remove phospholipids, which are unwanted molecules [120,121].

Another group of viruses related to mimiviruses was first described through metagenomics approaches, the so-called klosneuviruses. Similar to tupanviruses, the klosneuviruses possess an extensive protein translation apparatus and comprise a distinct clade within *Mimiviridae* [122]. In recent years, a few viruses have been isolated, corroborating the existence of the putative Klosneuviridae subfamily with highly complex genomes reaching up to 2.0 Mb and over 1000 genes (Table 1) [123,124]. Members of the Klosneuvirinae group have many genes associated with distinct functions (Figure 3). Similar to other mimiviruses, the klosneuviruses have many glycosyltransferases, composing the glycosylation machinery of these giant viruses. For instance, Fadolivirus has at least 20 glycosyltransferases, one of the most complex glycosylation apparatuses observed in a virus. Additionally, a robust apparatus for DNA replication and repair are found, including several endonucleases, topoisomerases, and helicases. As for other giants, most of the genes coding for klosneuviruses remain to be characterized, and in-depth investigation might reveal plenty of new enzymes applicable in biotechnology.

Besides the *Mimiviridae* family, several other groups of large and giant viruses of amoeba are proposed to be part of the *Nucleocytoviricota* phylum, such as Marseilleviruses, pandoraviruses, molliviruses, pithoviruses, cedratviruses, Faustoviruses, kaumoebaviruses, and orpheoviruses, among others [14]. In 2009, the first Marseillevirus isolate was found in a water sample from a Paris cooling tower, characterizing the second and widely distributed

new family of NCLDV viruses that infect amoebas [125]. From there, new viruses were discovered in samples of water, soil, mussels, and even humans, totaling more than 50 isolates found in different places worldwide, including Europe, Africa, America, Oceania, and Asia. Unlike mimiviruses, the Marseilleviruses do not have a robust translation-related gene set, but code for different types of histone-like proteins, a remarkable characteristic of the family [126,127]. More recently, other viruses isolated in France (Clandestino virus) and Japan (Medusavirus) expanded the histone-like proteins in the virosphere [128]. It was shown that the doublet histones are essential for Marseillevirus infectivity and that they form nucleosome-like structures, thus analogously organizing the viral genome as eukaryotes [129]. Additionally, Marseillevirus genomes present a high rate of mosaicism since the genes have different putative origins, such as other viruses, bacteria, archaea, and eukaryotes [125,130]. Similar to phycodnaviruses, some Marseilleviruses and other giant viruses of amoebae have a complex restriction–modification system composed of different methyltransferases, suggesting the involvement in diverse forms of virus–host interactions [63]. These enzymes are important tools in biotechnology, applied to facilitate DNA-based genetic engineering [131]. Additionally, interesting as molecular biology tools, Marseilleviruses encode many proteins involved in RNA processing, such as RNase H, mRNA capping enzyme, and RNA ligase. There is still no information about how these enzymes work in the virus cycle, but further characterization can lead to exciting discoveries for both virus biology and biotechnology.

The first members of the putative family Pandoraviridae were described in 2013. Pandoravirus salinus was isolated from samples collected on the central coast of Chile, with a genome size of 2.5 Mb, and Pandoravirus dulcis in a freshwater lagoon in Melbourne (Australia), with a genome of 1.9 Mb [132]. Compared to mimiviruses, they have a giant genome with 93% non-recognizable homologs, while mimiviruses have around 50% [105,132]. This giant genome harbors genes involved in functions that raise many questions about the nature of viruses. Unlike other nucleocytoviruses, the pandoraviruses do not code for the typical double-jelly-roll capsid protein. Moreover, a recent study suggested that pandoraviruses code for homologs of enzymes involved in the tricarboxylic acid cycle (TCA), including a functional isocitrate dehydrogenase. The TCA is related to acetyl-CoA oxidation to produce energy in cellular organisms. Interestingly, these pandoraviruses' putative enzymes are transcribed during the pandoravirus massiliensis replication cycle, highlighting their importance during the infection [133].

In this context, viruses can be a passive vehicle for transporting genes through host cells, but they also participate in recycling nutrients to these hosts in their natural environment [134]. Notably, some phage genes are functional in cyanobacteria photosynthesis during infection and can act as supplement proteins in these organisms [135]. In the same way, genes enrolled in cell energy production present in giant viruses, such as pandoraviruses, can enhance physiological machinery present in the host cells with biotechnological interest, such as those enrolled in photosynthesis [133]. Horizontal gene transfer between giant viruses and their hosts is widely discussed, especially considering those that infect algae. This event can explain how they carry peculiar genes in their genomes that act on viral DNA replication or protein synthesis, in addition to enhancing the physiological potential of their hosts [136]. This is similar to the presence of unexpected genes enrolled in cellular redox potential, including thioredoxin family protein, thiol oxidoreductase, and ferric reductase. They also have transporters for inorganic ions, such as ammonium, magnesium, and phosphate. These proteins are commonly found in algae and are vital for viral and cell host injury survival, but they can also contribute to modifying the chemical composition of the environment, e.g., ferric reductases can facilitate iron uptake [8,137–139]. This mechanism in chlorella algae is widely studied since these organisms are natural iron chelators, but the reason why viruses that infect these algae carry those genes remains curious [140,141].

Other groups include icosahedral viruses closely related to *Asfarviridae*, the Faustoviruses, kaumobaviruses, and pacmanvirus [142–144]. Faustoviruses were first reported

in 2015, with eight distinct strains infecting *Vermamoeba vermiformis*, a protozoan associated with human environments. They are icosahedral-shaped viruses of around 200 nm and have a genome size of about 466 kbp (Table 1) [142]. These viruses have many different enzymes. Recently the release of the Faustovirus Capping Enzyme (FCE), an enzyme combining high activity and a broad temperature range applicable in mRNA manufacturing, was announced, corroborating the importance of giant viruses as a source of new enzymes [45]. Pacmanvirus A23 and kaumobavirus also have mRNA capping enzymes, and despite low identity (~30%), it is possible that such homologs are also active and applicable in further assays. In addition, these viruses have DNA ligases and restriction endonucleases, enzymes extensively used as molecular biology tools. Additionally, they have different proteases (e.g., serine and cysteine protease). Proteases have long been used in biotechnology and industries, with applications in various processes such as detergent, textile, leather, and dairy products [2]. These proteins usually come from fungi and bacteria, and now viruses appear as a promising source of new proteases.

Finally, a group of ellipsoid viruses exhibits peculiar features, with giant particles and relatively small circular DNA genomes, composing a putative family Pithoviridae. The first pithovirus was isolated from Siberian permafrost samples dated 30,000-years-old [145]. A few years later, a contemporary relative was isolated in France, and more recently, metagenomics studies found several genomes similar to pithoviruses expanding the new group [146,147]. These viruses have the largest particles ever described, with a mean value of 1.5 μm and dsDNA genomes of ~610 kbp. As for other giant viruses, most of the genes coded by pithoviruses are yet to be characterized, but there are some interesting genes for possible application in biotechnology, including serine protease, methyltransferase, DNA ligase, and nucleases (both DNase and RNase). Cedratviruses have a similar enzymatic profile. These viruses form a sister clade of pithoviruses, having similar ellipsoid particles of ~1.0 μm and circular dsDNA genomes ranging from 460–590 kbp [131]. It is interesting to note that giant viruses have active methyltransferases and nucleases, constituting a viral restriction-modification system [63]. These systems could be further exploited for exogenous gene expression regulation and DNA plasmid stability as promising biotechnology tools [148]. Completing this putative new taxon is Orpheovirus, an oval-shaped virus of 900–1300 nm with circular dsDNA of 1.4 Mb [148]. Despite some similarities with pithoviruses, including viral particle and replication cycle [149], there are considerable genomic differences (e.g., the presence of translational-related genes), and phylogenetic analysis put Orpheovirus as a distant relative of pithoviruses, possibly inaugurating a new viral family Orpheoviridae. There is still limited information about these viruses, with only one viral isolate and a few genomes found by metagenomics [148,150]. Yet, it is interesting to note that these viruses have robust enzymatic machinery of interest for application in biotechnology, composed of nucleases, ligases, helicases, and lipases.

5. Conclusions and Future Directions

Giant viruses have genetic, proteomic, and structural complexities unique to the virosphere. Their large genome carries not only structural genes or elements necessary for DNA replication, but also genes of complex machinery common to organisms, such as bacteria, archaea, and small eukaryotes. It includes methyltransferase and glycosylation systems, as well as several enzymes involved in protein, carbohydrates, and polysaccharides metabolism. In addition to a vast genetic repertoire, viral particles harbor mRNAs that can encode different proteins [151,152]. Although most of their genomes are still unknown, studies indicate a correlation between the discovery of new genes and the prospecting and isolation of new viruses, showing an open pan-genome in these viruses [56,153]. One can expect that, with the isolation of more viruses from unexplored regions of the Earth, it will be possible to identify a plethora of new genes with the most diverse functional activities that could be explored through the lens of biotechnology. In fact, a few years ago, a completely new amoeba-infecting virus was isolated and characterized in Brazil: the Yaravirus. This curious small virus (80 nm) that appears among the amoeba-infecting giants

has around 90% of its genome composed of ORFans, and further characterization might reveal important novel elements essential for the virus replication and possible application in biotechnology [154]. Due to its remarkable and different features, yaravirus is currently classified into the *Yaraviridae* family by ICTV [155]. Together, all these genomic features of amoebal and algae viruses highlight their potential as biotechnological tools.

Metagenomics studies suggest that viral particles are more prevalent in aquatic environments than bacteria and that phycodnaviruses constitute one of the most abundant viral groups in the ocean. Metagenomics approaches deeply impacted and expanded the field of giant viruses in recent years (for a more extensive review, please see [15]). Using this strategy, a plethora of new genomes was recovered from different places around the world, dramatically improving the phylogenetic diversity of these viruses and providing important insights into virus-host interactions [137,156]. Additionally, these studies provided information on the dynamics of genome evolution, revealing many new protein-coding genes that could be further explored through the lens of biotechnology. Metagenomics studies performed in forest soils and deep-sea sediments have uncovered a hidden diversity of giant viruses in this environment, evidencing that they are really ubiquitous in our planet [157,158].

Many studies argue that aquatic viruses represent the greatest unexplored genetic diversity on the planet [16,159–162]. It is worth noting that such diversity will likely improve in the years to come due to climate change, allowing new discoveries. Recent metagenomics studies in permafrost led to the discovery of new giant viruses, constituting a large reservoir of genes of unknown function [150]. A few giant viruses have already been recovered from Siberian permafrosts, raising the question of what else could be brought to the surface with climate change [145,163]. Exploring such genetic richness will bring exciting innovations that can be the key to different problems we are dealing with and might come across in the biotechnological field. Using new approaches for better characterizing the giant viruses' genomes with new algorithms by applying artificial intelligence (e.g., AlphaFold) and further advancing with the biological characterization of new proteins is the next step of possible scientific breakthroughs. Giant viruses are everywhere, just waiting for scientists to face the challenge of unraveling their mysteries and finding innovative ways to use their complex enzymatic machinery to improve science.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens11121453/s1>, Table S1: Presence and distribution of enzymes in the *Phycodnaviridae* family; Table S2: TM-score of *B. cereus*, Tupanvirus and PBCV-1 target sequences compared to their templates from SWISS-MODEL and/or RoseTTAFold; Figure S1: Models of chitinases from microbial sources obtained by RoseTTAFold [164] from the Robetta server [165] for protein structure prediction. Models from each microorganism represented as drawing (A) and surface structures (B) of *Bacillus cereus* (dark gray), Tupanvirus (cyan), and PBCV-1 (pink). (C) Overlap of three-dimensional chitinase protein structures obtained by SWISS-MODEL and RoseTTAFold methods. The modeling of each target sequence was assessed selecting only RoseTTAFold as an option. Model alignment and analysis were assessed with the PyMOL software (v0.99c).

Author Contributions: Conceptualization, R.A.L.R.; methodology, R.A.L.R. and E.G.d.O.; formal analysis, E.G.d.O., J.V.R.P.C., C.A.d.C.F. and R.A.L.R.; investigation, E.G.d.O., J.V.R.P.C. and C.A.d.C.F.; data curation, J.V.R.P.C. and C.A.d.C.F.; writing—original draft preparation, E.G.d.O., B.B.B., L.R.H. and B.L.d.A.; writing—review and editing, R.A.L.R.; supervision, R.A.L.R. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work was funded by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) and FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) in terms of scholarships granted to the Graduate Program in Microbiology at the Federal University of Minas Gerais.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: All genomic data used in this work are publicly available at GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

Acknowledgments: We thank all the members and colleagues of the Virus Laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Brazil, for all the scientific and technical support during the preparation of this work. Special thanks is given to Mateus Serafim for helping with chitinase modeling and data interpretation.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

References

1. Fasim, A.; More, V.S.; More, S.S. Large-Scale Production of Enzymes for Biotechnology Uses. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2021**, *69*, 68–76. [[CrossRef](#)]
2. Singh, R.; Kumar, M.; Mittal, A.; Mehta, P.K. Microbial Enzymes: Industrial Progress in 21st Century. *3 Biotech* **2016**, *6*, 174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Varanda, C.; do Rosário Félix, M.; Campos, M.D.; Materatski, P. An Overview of the Application of Viruses to Biotechnology. *Viruses* **2021**, *13*, 2073. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Coffin, J.M.; Fan, H. The Discovery of Reverse Transcriptase. *Annu. Rev. Virol.* **2016**, *3*, 29–51. [[CrossRef](#)]
5. Briers, Y. Phage Lytic Enzymes. *Viruses* **2019**, *11*, 113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Olsen, N.M.C.; Thiran, E.; Hasler, T.; Vanzieleghem, T.; Belibasakis, G.N.; Mahillon, J.; Loessner, M.J.; Schmelcher, M. Synergistic Removal of Static and Dynamic *Staphylococcus aureus* Biofilms by Combined Treatment with a Bacteriophage Endolysin and a Polysaccharide Depolymerase. *Viruses* **2018**, *10*, 438. [[CrossRef](#)]
7. Nasir, A.; Romero-Severson, E.; Claverie, J.-M. Investigating the Concept and Origin of Viruses. *Trends Microbiol.* **2020**, *28*, 959–967. [[CrossRef](#)]
8. Brahim Belhaouari, D.; Pires De Souza, G.A.; Lamb, D.C.; Kelly, S.L.; Goldstone, J.V.; Stegeman, J.J.; Colson, P.; La Scola, B.; Aherfi, S. Metabolic Arsenal of Giant Viruses: Host Hijack or Self-Use? *eLife* **2022**, *11*, e78674. [[CrossRef](#)]
9. Kawakami, H.; Kawakami, N. Behavior of a Virus in a Symbiotic System, *Paramecium bursaria*—Zoochlorella. *J. Protozool.* **1978**, *25*, 217–225. [[CrossRef](#)]
10. Van Etten, J.L.; Meints, R.H.; Burbank, D.E.; Kuczumski, D.; Cuppels, D.A.; Lane, L.C. Isolation and Characterization of a Virus from the Intracellular Green Alga Symbiotic with *Hydra viridis*. *Virology* **1981**, *113*, 704–711. [[CrossRef](#)]
11. Van Etten, J.L.; Agarkova, I.V.; Dunigan, D.D. Chloroviruses. *Viruses* **2020**, *12*, 20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. La Scola, B.; Audic, S.; Robert, C.; Jungang, L.; de Lamballerie, X.; Drancourt, M.; Birtles, R.; Claverie, J.-M.; Raoult, D. A Giant Virus in Amoebae. *Science* **2003**, *299*, 2033. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Colson, P.; Yutin, N.; Shabalina, S.A.; Robert, C.; Fournous, G.; La Scola, B.; Raoult, D.; Koonin, E.V. Viruses with More Than 1000 Genes: Mamavirus, a New *Acanthamoeba polyphagumimivirus* Strain, and Reannotation of Mimivirus Genes. *Genome Biol. Evol.* **2011**, *3*, 737–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Koonin, E.V.; Dolja, V.V.; Krupovic, M.; Varsani, A.; Wolf, Y.I.; Yutin, N.; Zerbini, F.M.; Kuhn, J.H. Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2020**, *84*, e00061-19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Schulz, F.; Abergel, C.; Woyke, T. Giant Virus Biology and Diversity in the Era of Genome-Resolved Metagenomics. *Nat. Rev. Microbiol.* **2022**, *20*, 721–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Endo, H.; Blanc-Mathieu, R.; Li, Y.; Salazar, G.; Henry, N.; Labadie, K.; de Vargas, C.; Sullivan, M.B.; Bowler, C.; Wincker, P.; et al. Biogeography of Marine Giant Viruses Reveals Their Interplay with Eukaryotes and Ecological Functions. *Nat. Ecol. Evol.* **2020**, *4*, 1639–1649. [[CrossRef](#)]
17. Guglielmini, J.; Woo, A.C.; Krupovic, M.; Forterre, P.; Gaia, M. Diversification of Giant and Large Eukaryotic DsDNA Viruses Predated the Origin of Modern Eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 19585–19592. [[CrossRef](#)]
18. Kang, M.; Dunigan, D.D.; Van Etten, J.L. Chlorovirus: A Genus of Phycodnaviridae That Infects Certain Chlorella-like Green Algae. *Mol. Plant Pathol.* **2005**, *6*, 213–224. [[CrossRef](#)]
19. Van Etten, J.L.; Schuster, A.M.; Girton, L.; Burbank, D.E.; Swinton, D.; Hattman, S. DNA Methylation of Viruses Infecting a Eukaryotic Chlorella-like Green Alga. *Nucleic Acids Res.* **1985**, *13*, 3471–3478. [[CrossRef](#)]
20. ICTV. Current ICTV Taxonomy Release. Available online: <https://ictv.global/taxonomy> (accessed on 1 October 2022).
21. Van Etten, J.L.; Dunigan, D.D.; Nagasaki, K.; Schroeder, D.C.; Grimsley, N.; Brussaard, C.P.D.; Nissimov, J.I. Phycodnaviruses (Phycodnaviridae). In *Encyclopedia of Virology*, 4th ed.; Bamford, D.H., Zuckerman, M., Eds.; Academic Press: Oxford, UK, 2021; pp. 687–695, ISBN 978-0-12-814516-6.
22. Schroeder, D.C.; Oke, J.; Malin, G.; Wilson, W.H. Coccolithovirus (Phycodnaviridae): Characterisation of a New Large DsDNA Algal Virus That Infects *Emiliana huxleyi*. *Arch. Virol.* **2002**, *147*, 1685–1698. [[CrossRef](#)]
23. Wilson, W.H.; Schroeder, D.C.; Allen, M.J.; Holden, M.T.G.; Parkhill, J.; Barrell, B.G.; Churcher, C.; Hamlin, N.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; et al. Complete Genome Sequence and Lytic Phase Transcription Profile of a *Coccolithovirus*. *Science* **2005**, *309*, 1090–1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

24. Li, M.-L.; Stollar, V. Alphaviruses and Apoptosis. *Int. Rev. Immunol.* **2004**, *23*, 7–24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Allen, M.J.; Howard, J.A.; Lilley, K.S.; Wilson, W.H. Proteomic Analysis of the EhV-86 Virion. *Proteome Sci.* **2008**, *6*, 11. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Nainu, F.; Shiratsuchi, A.; Nakanishi, Y. Induction of Apoptosis and Subsequent Phagocytosis of Virus-Infected Cells as an Antiviral Mechanism. *Front. Immunol.* **2017**, *8*, 1220. [[CrossRef](#)]
27. Ku, C.; Sheyn, U.; Sebé-Pedrós, A.; Ben-Dor, S.; Schatz, D.; Tanay, A.; Rosenwasser, S.; Vardi, A. A Single-Cell View on Alga-Virus Interactions Reveals Sequential Transcriptional Programs and Infection States. *Sci. Adv.* **2020**, *6*, eaba4137. [[CrossRef](#)]
28. Yunoki, K.; Kukino, O.; Nadachi, Y.; Fujino, T.; Ohnishi, M. Separation and Determination of Functional Complex Lipids from Chicken Skin. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2008**, *85*, 427–433. [[CrossRef](#)]
29. Miazek, K.; Lebecque, S.; Hamaidia, M.; Paul, A.; Danthine, S.; Willems, L.; Frédérick, M.; Pauw, E.D.; Deleu, M.; Richel, A.; et al. Sphingolipids: Promising Lipid-Class Molecules with Potential Applications for Industry. A Review. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* **2016**, *20*, 321–336. [[CrossRef](#)]
30. Nissimov, J.I.; Worthy, C.A.; Rooks, P.; Napier, J.A.; Kimmance, S.A.; Henn, M.R.; Ogata, H.; Allen, M.J. Draft Genome Sequence of the *Coccolithovirus emiliana* Huxleyi Virus 202. *J. Virol.* **2012**, *86*, 2380–2381. [[CrossRef](#)]
31. Delaroque, N.; Müller, D.G.; Bothe, G.; Pohl, T.; Knippers, R.; Boland, W. The Complete DNA Sequence of the *Ectocarpus siliculosus* Virus EsV-1 Genome. *Virology* **2001**, *287*, 112–132. [[CrossRef](#)]
32. Merrick, C.A.; Zhao, J.; Rosser, S.J. Serine Integrases: Advancing Synthetic Biology. *ACS Synth. Biol.* **2018**, *7*, 299–310. [[CrossRef](#)]
33. Hickman, A.B.; Dyda, F. Mechanisms of DNA Transposition. *Microbiol. Spectr.* **2015**, *3*, 2. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Schroeder, D.C.; Park, Y.; Yoon, H.-M.; Lee, Y.S.; Kang, S.W.; Meints, R.H.; Ivey, R.G.; Choi, T.-J. Genomic Analysis of the Smallest Giant Virus—*Feldmannia* Sp. Virus 158. *Virology* **2009**, *384*, 223–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Weynberg, K.D.; Allen, M.J.; Ashelford, K.; Scanlan, D.J.; Wilson, W.H. From Small Hosts Come Big Viruses: The Complete Genome of a Second *Ostreococcus tauri* Virus, OtV-1. *Environ. Microbiol.* **2009**, *11*, 2821–2839. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Derelle, E.; Ferraz, C.; Escande, M.-L.; Eychenié, S.; Cooke, R.; Piganeau, G.; Desdevises, Y.; Bellec, L.; Moreau, H.; Grimsley, N. Life-Cycle and Genome of OtV5, a Large DNA Virus of the Pelagic Marine Unicellular Green Alga *Ostreococcus tauri*. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2250. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Zhang, L.; Becker, D.F. Connecting Proline Metabolism and Signaling Pathways in Plant Senescence. *Front. Plant Sci.* **2015**, *6*, 552. [[CrossRef](#)]
38. Piacente, F.; Gaglianone, M.; Laugieri, M.E.; Tonetti, M.G. The Autonomous Glycosylation of Large DNA Viruses. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 29315–29328. [[CrossRef](#)]
39. Speciale, I.; Notaro, A.; Abergel, C.; Lanzetta, R.; Lowary, T.; Molinaro, A.; Tonetti, M.; Etten, J.; Castro, C. The Astounding World of Glycans from Giant Viruses. *Chem. Rev.* **2022**, *122*, 15717–15766. [[CrossRef](#)]
40. Mohamed, Z.A. Potentially Harmful Microalgae and Algal Blooms in the Red Sea: Current Knowledge and Research Needs. *Mar. Environ. Res.* **2018**, *140*, 234–242. [[CrossRef](#)]
41. Ogura, Y.; Hayashi, T.; Ueki, S. Complete Genome Sequence of a Phycodnavirus, *Heterosigma akashiwo* Virus Strain 53. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e01279-16. [[CrossRef](#)]
42. Nicholson, A.W. Ribonuclease III Mechanisms of Double-Stranded RNA Cleavage. *WIREs RNA* **2014**, *5*, 31–48. [[CrossRef](#)]
43. Ramanathan, A.; Robb, G.B.; Chan, S.-H. MRNA Capping: Biological Functions and Applications. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 7511–7526. [[CrossRef](#)]
44. Decroly, E.; Ferron, F.; Lescar, J.; Canard, B. Conventional and Unconventional Mechanisms for Capping Viral MRNA. *Nat. Rev. Microbiol.* **2012**, *10*, 51–65. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. NEB. New England Biolabs® Introduces Faustovirus Capping Enzyme, a Novel Enzymatic MRNA Capping Solution for MRNA Manufacturing. Available online: <https://international.neb.com/about-neb/news-and-press-releases/new-england-biolabs-introduces-faustovirus-capping-enzyme-a-novel-enzymatic-mrna-capping-solution-for-mrna-manufacturing> (accessed on 1 October 2022).
46. Santini, S.; Jeudy, S.; Bartoli, J.; Poirrot, O.; Lescot, M.; Abergel, C.; Barbe, V.; Wommack, K.E.; Noordeloos, A.A.M.; Brussaard, C.P.D.; et al. Genome of *Phaeocystis globosa* Virus PgV-16T Highlights the Common Ancestry of the Largest Known DNA Viruses Infecting Eukaryotes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 10800–10805. [[CrossRef](#)]
47. De Maria, L.; Vind, J.; Oxenbøll, K.M.; Svendsen, A.; Patkar, S. Phospholipases and Their Industrial Applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2007**, *74*, 290–300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Lomelino, C.L.; Andring, J.T.; McKenna, R.; Kilberg, M.S. Asparagine Synthetase: Function, Structure, and Role in Disease. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 19952–19958. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Meints, R.H.; Van Etten, J.L.; Kuczmarski, D.; Lee, K.; Ang, B. Viral Infection of the Symbiotic *Chlorella*-like Alga Present in *Hydra viridis*. *Virology* **1981**, *113*, 698–703. [[CrossRef](#)]
50. Van Etten, J.L.; Meints, R.H.; Kuczmarski, D.; Burbank, D.E.; Lee, K. Viruses of Symbiotic *Chlorella*-like Algae Isolated from *Paramecium bursaria* and *Hydra viridis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**, *79*, 3867–3871. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Yamada, T. Isolation and Characterization of Chloroplast DNA from *Chlorella ellipsoidea*. *Plant Physiol.* **1982**, *70*, 92–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

52. Quispe, C.F.; Esmael, A.; Sonderman, O.; McQuinn, M.; Agarkova, I.; Battah, M.; Duncan, G.A.; Dunigan, D.D.; Smith, T.P.L.; De Castro, C.; et al. Characterization of a New Chlorovirus Type with Permissive and Non-Permissive Features on Phylogenetically Related Algal Strains. *Virology* **2017**, *500*, 103–113. [[CrossRef](#)]
53. Seitzer, P.; Jeanniard, A.; Ma, F.; Van Etten, J.; Facciotti, M.; Dunigan, D. Gene Gangs of the Chloroviruses: Conserved Clusters of Collinear Monocistronic Genes. *Viruses* **2018**, *10*, 576. [[CrossRef](#)]
54. Jeanniard, A.; Dunigan, D.D.; Gurnon, J.R.; Agarkova, I.V.; Kang, M.; Vitek, J.; Duncan, G.; McClung, O.W.; Larsen, M.; Claverie, J.-M.; et al. Towards Defining the Chloroviruses: A Genomic Journey through a Genus of Large DNA Viruses. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Zhang, Y.; Strasser, P.; Grabherr, R.; Van Etten, J.L. Hairpin Loop Structure at the Termini of the Chlorella Virus PBCV-1 Genome. *Virology* **1994**, *202*, 1079–1082. [[CrossRef](#)]
56. Rodrigues, R.A.L.; Queiroz, V.F.; Ghosh, J.; Dunigan, D.D.; Van Etten, J.L. Functional Genomic Analyses Reveal an Open Pan-Genome for the Chloroviruses and a Potential for Genetic Innovation in New Isolates. *J. Virol.* **2022**, *96*, e0136721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Lohman, G.J.S.; Zhang, Y.; Zhelkovsky, A.M.; Cantor, E.J.; Evans, T.C., Jr. Efficient DNA Ligation in DNA–RNA Hybrid Helices by Chlorella Virus DNA Ligase. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 1831–1844. [[CrossRef](#)]
58. Krzywkowski, T.; Nilsson, M. Fidelity of RNA Templated End-Joining by Chlorella Virus DNA Ligase and a Novel iLock Assay with Improved Direct RNA Detection Accuracy. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, e161. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Zhang, Y.; Nelson, M.; Nietfeldt, J.W.; Burbank, D.E.; Van Etten, J.L. Characterization of Chlorella Virus PBCV-1 C ViAII Restriction and Modification System. *Nucleic Acids Res.* **1992**, *20*, 5351–5356. [[CrossRef](#)]
60. DeAngelis, P.L.; Jing, W.; Graves, M.V.; Burbank, D.E.; Van Etten, J.L. Hyaluronan Synthase of Chlorella Virus PBCV-1. *Science* **1997**, *278*, 1800–1803. [[CrossRef](#)]
61. Landstein, D.; Graves, M.V.; Burbank, D.E.; DeAngelis, P.; Van Etten, J.L. Chlorella Virus PBCV-1 Encodes Functional Glutamine: Fructose-6-Phosphate Amidotransferase and UDP-Glucose Dehydrogenase Enzymes. *Virology* **1998**, *250*, 388–396. [[CrossRef](#)]
62. Kawasaki, T.; Tanaka, M.; Fujie, M.; Usami, S.; Sakai, K.; Yamada, T. Chitin Synthesis in Chlorovirus CVK2-Infected Chlorella Cells. *Virology* **2002**, *302*, 123–131. [[CrossRef](#)]
63. Jeudy, S.; Rigou, S.; Alempic, J.-M.; Claverie, J.-M.; Abergel, C.; Legendre, M. The DNA Methylation Landscape of Giant Viruses. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 2657. [[CrossRef](#)]
64. Graves, M.V.; Burbank, D.E.; Roth, R.; Heuser, J.; DeAngelis, P.L.; Van Etten, J.L. Hyaluronan Synthesis in Virus PBCV-1-Infected Chlorella-like Green Algae. *Virology* **1999**, *257*, 15–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Viola, M.; Vigetti, D.; Karousou, E.; D’Angelo, M.L.; Caon, I.; Moretto, P.; De Luca, G.; Passi, A. Biology and Biotechnology of Hyaluronan. *Glycoconj. J.* **2015**, *32*, 93–103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Motolese, A.; Vignati, F.; Brambilla, R.; Cerati, M.; Passi, A. Interaction between a Regenerative Matrix and Wound Bed in Nonhealing Ulcers: Results with 16 Cases. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 849321. [[CrossRef](#)]
67. Petrey, A.C.; de la Motte, C.A. Hyaluronan, a Crucial Regulator of Inflammation. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 101. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Maytin, E.V. Hyaluronan: More than Just a Wrinkle Filler. *Glycobiology* **2016**, *26*, 553–559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Agarkova, I.V.; Lane, L.C.; Dunigan, D.D.; Quispe, C.F.; Duncan, G.A.; Milrot, E.; Minsky, A.; Esmael, A.; Ghosh, J.S.; Van Etten, J.L. Identification of a Chlorovirus PBCV-1 Protein Involved in Degrading the Host Cell Wall during Virus Infection. *Viruses* **2021**, *13*, 782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Kapaun, E.; Reisser, W. A Chitin-like Glycan in the Cell Wall of a *Chlorella* Sp. (Chlorococcales, Chlorophyceae). *Planta* **1995**, *197*, 577–582. [[CrossRef](#)]
71. Rakkhumkaew, N.; Kawasaki, T.; Fujie, M.; Yamada, T. Chitin Synthesis by Chlorella Cells Infected by Chloroviruses: Enhancement by Adopting a Slow-Growing Virus and Treatment with Aphidicolin. *J. Biosci. Bioeng.* **2018**, *125*, 311–315. [[CrossRef](#)]
72. Yamada, T.; Chuchird, N.; Kawasaki, T.; Nishida, K.; Hiramatsu, S. Chlorella Viruses as a Source of Novel Enzymes. *J. Biosci. Bioeng.* **1999**, *88*, 353–361. [[CrossRef](#)]
73. Oyeleye, A.; Normi, Y.M. Chitinase: Diversity, Limitations, and Trends in Engineering for Suitable Applications. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, BSR2018032300. [[CrossRef](#)]
74. Wucher, B.R.; Bartlett, T.M.; Hoyos, M.; Papenfort, K.; Persat, A.; Nadell, C.D. *Vibrio Cholerae* Filamentation Promotes Chitin Surface Attachment at the Expense of Competition in Biofilms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 14216–14221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Ghasemi, S.; Ahmadian, G.; Jelodar, N.B.; Rahimian, H.; Ghandili, S.; Dehestani, A.; Shariati, P. Antifungal Chitinases from *Bacillus pumilus* SG2: Preliminary Report. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 1437–1443. [[CrossRef](#)]
76. Hjort, K.; Presti, I.; Elväng, A.; Marinelli, F.; Sjöling, S. Bacterial Chitinase with Phytopathogen Control Capacity from Suppressive Soil Revealed by Functional Metagenomics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2014**, *98*, 2819–2828. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jung, W.-J.; Park, R.-D. Bioproduction of Chitooligosaccharides: Present and Perspectives. *Mar. Drugs* **2014**, *12*, 5328–5356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hamed, I.; Özogul, F.; Regenstein, J.M. Industrial Applications of Crustacean By-Products (Chitin, Chitosan, and Chitooligosaccharides): A Review. *Trends Food Sci. Technol.* **2016**, *48*, 40–50. [[CrossRef](#)]

79. Shen, K.-T.; Chen, M.-H.; Chan, H.-Y.; Jeng, J.-H.; Wang, Y.-J. Inhibitory Effects of Chitooligosaccharides on Tumor Growth and Metastasis. *Food Chem. Toxicol.* **2009**, *47*, 1864–1871. [[CrossRef](#)]
80. Azuma, K.; Osaki, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6*, 33–49. [[CrossRef](#)]
81. Thakur, N.; Nath, A.K.; Chauhan, A.; Gupta, R. Purification, Characterization, and Antifungal Activity of *Bacillus cereus* Strain NK91 Chitinase from Rhizospheric Soil Samples of Himachal Pradesh, India. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **2022**, *69*, 1830–1842. [[CrossRef](#)]
82. Abulikemu, S.; Yesilyurt, A.; Gencer, D.; Usta, M.; Nalcacioglu, R. Comparison of the Potential Activities of Viral and Bacterial Chitinases. *Egypt. J. Biol. Pest Control* **2021**, *31*, 91. [[CrossRef](#)]
83. Tonetti, M.; Zanardi, D.; Gurnon, J.R.; Fruscione, F.; Armirotti, A.; Damonte, G.; Sturla, L.; Flora, A.D.; Etten, J.L.V. *Paramecium bursaria* Chlorella Virus 1 Encodes Two Enzymes Involved in the Biosynthesis of GDP-L-Fucose and GDP-D-Rhamnose. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21559–21565. [[CrossRef](#)]
84. Vigerust, D.J.; Shepherd, V.L. Virus Glycosylation: Role in Virulence and Immune Interactions. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 211–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Graves, M.V.; Bernadt, C.T.; Cerny, R.; Van Etten, J.L. Molecular and Genetic Evidence for a Virus-Encoded Glycosyltransferase Involved in Protein Glycosylation. *Virology* **2001**, *285*, 332–345. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Speciale, I.; Duncan, G.A.; Unione, L.; Agarkova, I.V.; Garozzo, D.; Jimenez-Barbero, J.; Lin, S.; Lowary, T.L.; Molinaro, A.; Noel, E.; et al. The N-Glycan Structures of the Antigenic Variants of Chlorovirus PBCV-1 Major Capsid Protein Help to Identify the Virus-Encoded Glycosyltransferases. *J. Biol. Chem.* **2019**, *294*, 5688–5699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Tonetti, M.; Sturla, L.; Bisso, A.; Benatti, U.; Flora, A.D. Synthesis of GDP-L-Fucose by the Human FX Protein. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 27274–27279. [[CrossRef](#)]
88. Bonin, C.P.; Reiter, W.-D. A Bifunctional Epimerase-Reductase Acts Downstream of the MUR1 Gene Product and Completes the De Novo Synthesis of GDP-L-Fucose in Arabidopsis. *Plant J.* **2000**, *21*, 445–454. [[CrossRef](#)]
89. Barrows, B.D.; Haslam, S.M.; Bischof, L.J.; Morris, H.R.; Dell, A.; Aroian, R.V. Resistance to *Bacillus Thuringiensis* Toxin in *Caenorhabditis Elegans* from Loss of Fucose. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 3302–3311. [[CrossRef](#)]
90. Chang, A.; Singh, S.; Phillips, G.N.; Thorson, J.S. Glycosyltransferase Structural Biology and Its Role in the Design of Catalysts for Glycosylation. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2011**, *22*, 800–808. [[CrossRef](#)]
91. Schmölder, K.; Gutmann, A.; Diricks, M.; Desmet, T.; Nidetzky, B. Sucrose Synthase: A Unique Glycosyltransferase for Biocatalytic Glycosylation Process Development. *Biotechnol. Adv.* **2016**, *34*, 88–111. [[CrossRef](#)]
92. Gutmann, A.; Lepak, A.; Diricks, M.; Desmet, T.; Nidetzky, B. Glycosyltransferase Cascades for Natural Product Glycosylation: Use of Plant Instead of Bacterial Sucrose Synthases Improves the UDP-Glucose Recycling from Sucrose and UDP. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, 1600557. [[CrossRef](#)]
93. Loos, A.; Steinkellner, H. Plant Glyco-Biotechnology on the Way to Synthetic Biology. *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 523. [[CrossRef](#)]
94. Queiroz, V.F.; Rodrigues, R.A.L.; de Miranda Boratto, P.V.; La Scola, B.; Andreani, J.; Abrahão, J.S. Amoebae: Hiding in Plain Sight: Unappreciated Hosts for the Very Large Viruses. *Annu. Rev. Virol.* **2022**, *9*, 79–98. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Van Etten, J.L.; Meints, R.H. Giant Viruses Infecting Algae. *Annu. Rev. Microbiol.* **1999**, *53*, 447–494. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Fischer, M.G.; Allen, M.J.; Wilson, W.H.; Suttle, C.A. Giant Virus with a Remarkable Complement of Genes Infects Marine Zooplankton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19508–19513. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Assis, F.L.; Franco-Luiz, A.P.M.; Dos Santos, R.N.; Campos, F.S.; Dornas, F.P.; Borato, P.V.M.; Franco, A.C.; Abrahao, J.S.; Colson, P.; Scola, B.L. Genome Characterization of the First Mimiviruses of Lineage C Isolated in Brazil. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 2562. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. Boughalmi, M.; Saadi, H.; Pagnier, I.; Colson, P.; Fournous, G.; Raoult, D.; La Scola, B. High-Throughput Isolation of Giant Viruses of the *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* Families in the Tunisian Environment. *Environ. Microbiol.* **2013**, *15*, 2000–2007. [[CrossRef](#)]
99. Bajrai, L.H.; de Assis, F.L.; Azhar, E.I.; Jardot, P.; Robert, C.; Abrahão, J.; Raoult, D.; La Scola, B. Saudi Mousmouvirus, the First Group B Mimivirus Isolated from Asia. *Front. Microbiol.* **2016**, *7*, 2029. [[CrossRef](#)]
100. Takemura, M.; Mikami, T.; Murono, S. Nearly Complete Genome Sequences of Two Mimivirus Strains Isolated from a Japanese Freshwater Pond and River Mouth. *Genome Announc.* **2016**, *4*, e01378-16. [[CrossRef](#)]
101. Campos, R.K.; Boratto, P.V.; Assis, F.L.; Aguiar, E.R.; Silva, L.C.; Albarnaz, J.D.; Dornas, F.P.; Trindade, G.S.; Ferreira, P.P.; Marques, J.T.; et al. Samba Virus: A Novel Mimivirus from a Giant Rain Forest, the Brazilian Amazon. *Virol. J.* **2014**, *11*, 95. [[CrossRef](#)]
102. Colson, P.; de Lamballerie, X.; Fournous, G.; Raoult, D. Reclassification of Giant Viruses Composing a Fourth Domain of Life in the New Order Megavirales. *Intervirology* **2012**, *55*, 321–332. [[CrossRef](#)]
103. Yoosuf, N.; Yutin, N.; Colson, P.; Shabalina, S.A.; Pagnier, I.; Robert, C.; Azza, S.; Klose, T.; Wong, J.; Rossmann, M.G.; et al. Related Giant Viruses in Distant Locations and Different Habitats: *Acanthamoeba Polyphaga* Mousmouvirus Represents a Third Lineage of the Mimiviridae That Is Close to the Megavirus Lineage. *Genome Biol. Evol.* **2012**, *4*, 1324–1330. [[CrossRef](#)]
104. Arslan, D.; Legendre, M.; Seltzer, V.; Abergel, C.; Claverie, J.-M. Distant Mimivirus Relative with a Larger Genome Highlights the Fundamental Features of *Megaviridae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 17486–17491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Raoult, D.; Audic, S.; Robert, C.; Abergel, C.; Renesto, P.; Ogata, H.; La Scola, B.; Suzan, M.; Claverie, J.-M. The 1.2-Megabase Genome Sequence of Mimivirus. *Science* **2004**, *306*, 1344–1350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

106. Abrahão, J.S.; Araújo, R.; Colson, P.; La Scola, B. The Analysis of Translation-Related Gene Set Boosts Debates around Origin and Evolution of Mimiviruses. *PLoS Genet.* **2017**, *13*, e1006532. [[CrossRef](#)]
107. Rodrigues, R.A.L.; da Silva, L.C.F.; Abrahão, J.S. Translating the Language of Giants: Translation-Related Genes as a Major Contribution of Giant Viruses to the Virophere. *Arch. Virol.* **2020**, *165*, 1267–1278. [[CrossRef](#)]
108. Rajendran, V.; Kalita, P.; Shukla, H.; Kumar, A.; Tripathi, T. Aminoacyl-TRNA Synthetases: Structure, Function, and Drug Discovery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *111*, 400–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
109. Gomez, M.A.R.; Ibba, M. Aminoacyl-TRNA Synthetases. *RNA* **2020**, *26*, 910–936. [[CrossRef](#)]
110. Klose, T.; Kuznetsov, Y.G.; Xiao, C.; Sun, S.; McPherson, A.; Rossmann, M.G. The Three-Dimensional Structure of Mimivirus. *Intervirology* **2010**, *53*, 268–273. [[CrossRef](#)]
111. Abrahão, J.; Silva, L.; Silva, L.S.; Khalil, J.Y.B.; Rodrigues, R.; Arantes, T.; Assis, F.; Boratto, P.; Andrade, M.; Kroon, E.G.; et al. Tailed Giant Tupanvirus Possesses the Most Complete Translational Apparatus of the Known Virophere. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 749. [[CrossRef](#)]
112. Rodrigues, R.A.L.; Arantes, T.S.; Oliveira, G.P.; Dos Santos Silva, L.K.; Abrahão, J.S. The Complex Nature of Tupanviruses. *Adv. Virus Res.* **2019**, *103*, 135–166. [[CrossRef](#)]
113. Wu, X.; Tovilla-Coutiño, D.B.; Eiteman, M.A. Engineered Citrate Synthase Improves Citramalic Acid Generation in *Escherichia coli*. *Biotechnol. Bioeng.* **2020**, *117*, 2781–2790. [[CrossRef](#)]
114. Vigelsø, A.; Andersen, N.B.; Dela, F. The Relationship between Skeletal Muscle Mitochondrial Citrate Synthase Activity and Whole Body Oxygen Uptake Adaptations in Response to Exercise Training. *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.* **2014**, *6*, 84–101. [[PubMed](#)]
115. Oliveira, G.; Silva, L.; Leão, T.; Mougari, S.; da Fonseca, F.G.; Kroon, E.G.; La Scola, B.; Abrahão, J.S. Tupanvirus-Infected Amoebas Are Induced to Aggregate with Uninfected Cells Promoting Viral Dissemination. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 183. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Chettri, D.; Boro, M.; Sarkar, L.; Verma, A.K. Lectins: Biological Significance to Biotechnological Application. *Carbohydr. Res.* **2021**, *506*, 108367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
117. Schvarcz, C.R.; Steward, G.F. A Giant Virus Infecting Green Algae Encodes Key Fermentation Genes. *Virology* **2018**, *518*, 423–433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Shimizu, K. Main Metabolism. In *Bacterial Cellular Metabolic Systems*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2013; pp. 1–54, ISBN 978-1-907568-01-5.
119. Blanc-Mathieu, R.; Dahle, H.; Hofgaard, A.; Brandt, D.; Ban, H.; Kalinowski, J.; Ogata, H.; Sandaa, R.-A. A Persistent Giant Algal Virus, with a Unique Morphology, Encodes an Unprecedented Number of Genes Involved in Energy Metabolism. *J. Virol.* **2021**, *95*, e02446-20. [[CrossRef](#)]
120. Rajendran, A.; Palanisamy, A.; Thangavelu, V. Lipase Catalyzed Ester Synthesis for Food Processing Industries. *Braz. Arch. Biol. Technol.* **2009**, *52*, 207–219. [[CrossRef](#)]
121. Zhu, D.; Wu, Q.; Hua, L. Industrial Enzymes. In *Comprehensive Biotechnology*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2019; pp. 1–13, ISBN 978-0-444-64047-5.
122. Schulz, F.; Yutin, N.; Ivanova, N.N.; Ortega, D.R.; Lee, T.K.; Vierheilig, J.; Daims, H.; Horn, M.; Wagner, M.; Jensen, G.J.; et al. Giant Viruses with an Expanded Complement of Translation System Components. *Science* **2017**, *356*, 82–85. [[CrossRef](#)]
123. Bajrai, L.H.; Mougari, S.; Andreani, J.; Baptiste, E.; Delerce, J.; Raoult, D.; Azhar, E.I.; La Scola, B.; Levasseur, A. Isolation of Yasminevirus, the First Member of Klosneuvirinae Isolated in Coculture with *Vermamoeba vermiciformis*, Demonstrates an Extended Arsenal of Translational Apparatus Components. *J. Virol.* **2019**, *94*, e01534-19. [[CrossRef](#)]
124. Andreani, J.; Schulz, F.; Di Pinto, F.; Levasseur, A.; Woyke, T.; La Scola, B. Morphological and Genomic Features of the New Klosneuvirinae Isolate Fadolivirinae IHUMI-VV54. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 719703. [[CrossRef](#)]
125. Boyer, M.; Yutin, N.; Pagnier, I.; Barrassi, L.; Fournous, G.; Espinosa, L.; Robert, C.; Azza, S.; Sun, S.; Rossmann, M.G.; et al. Giant Marseillevirus Highlights the Role of Amoebae as a Melting Pot in Emergence of Chimeric Microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 21848–21853. [[CrossRef](#)]
126. Thomas, V.; Bertelli, C.; Collyn, F.; Casson, N.; Telenti, A.; Goesmann, A.; Croxatto, A.; Greub, G. Lausannevirus, a Giant Amoebal Virus Encoding Histone Doublets. *Environ. Microbiol.* **2011**, *13*, 1454–1466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
127. Valencia-Sánchez, M.I.; Abini-Agbomson, S.; Wang, M.; Lee, R.; Vasilyev, N.; Zhang, J.; De Ioannes, P.; La Scola, B.; Talbert, P.; Henikoff, S.; et al. The Structure of a Virus-Encoded Nucleosome. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **2021**, *28*, 413–417. [[CrossRef](#)]
128. Yoshikawa, G.; Blanc-Mathieu, R.; Song, C.; Kayama, Y.; Mochizuki, T.; Murata, K.; Ogata, H.; Takemura, M. Medusavirus, a Novel Large DNA Virus Discovered from Hot Spring Water. *J. Virol.* **2019**, *93*, e02130-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
129. Liu, Y.; Bisio, H.; Toner, C.M.; Jeudy, S.; Philippe, N.; Zhou, K.; Bowerman, S.; White, A.; Edwards, G.; Abergel, C.; et al. Virus-Encoded Histone Doublets Are Essential and Form Nucleosome-like Structures. *Cell* **2021**, *184*, 4237–4250.e19. [[CrossRef](#)]
130. Sahmi-Bounsiar, D.; Rolland, C.; Aherfi, S.; Boudjemaa, H.; Levasseur, A.; La Scola, B.; Colson, P. Marseilleviruses: An Update in 2021. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 648731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
131. Ren, J.; Lee, H.-M.; Shen, J.; Na, D. Advanced Biotechnology Using Methyltransferase and Its Applications in Bacteria: A Mini Review. *Biotechnol. Lett.* **2022**, *44*, 33–44. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
132. Philippe, N.; Legendre, M.; Doutre, G.; Couté, Y.; Poirot, O.; Lescot, M.; Arslan, D.; Seltzer, V.; Bertaux, L.; Bruley, C.; et al. Pandoraviruses: Amoeba Viruses with Genomes up to 2.5 Mb Reaching That of Parasitic Eukaryotes. *Science* **2013**, *341*, 281–286. [[CrossRef](#)]

133. Aherfi, S.; Brahim Belhaouari, D.; Pinault, L.; Baudoin, J.-P.; Decloquement, P.; Abrahao, J.; Colson, P.; Levasseur, A.; Lamb, D.C.; Chabriere, E.; et al. Incomplete Tricarboxylic Acid Cycle and Proton Gradient in Pandoravirus Massiliensis: Is It Still a Virus? *ISME J.* **2022**, *16*, 695–704. [[CrossRef](#)]
134. Forterre, P. The Virocell Concept and Environmental Microbiology. *ISME J.* **2013**, *7*, 233–236. [[CrossRef](#)]
135. Lindell, D.; Jaffe, J.D.; Johnson, Z.I.; Church, G.M.; Chisholm, S.W. Photosynthesis Genes in Marine Viruses Yield Proteins during Host Infection. *Nature* **2005**, *438*, 86–89. [[CrossRef](#)]
136. Irwin, N.A.T.; Pittis, A.A.; Richards, T.A.; Keeling, P.J. Systematic Evaluation of Horizontal Gene Transfer between Eukaryotes and Viruses. *Nat. Microbiol.* **2022**, *7*, 327–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Schulz, F.; Roux, S.; Paez-Espino, D.; Jungbluth, S.; Walsh, D.A.; Deneff, V.J.; McMahon, K.D.; Konstantinidis, K.T.; Eloe-Fadrosh, E.A.; Kyripides, N.C.; et al. Giant Virus Diversity and Host Interactions through Global Metagenomics. *Nature* **2020**, *578*, 432–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Bombelli, P.; Zarrouati, M.; Thorne, R.J.; Schneider, K.; Rowden, S.J.L.; Ali, A.; Yunus, K.; Cameron, P.J.; Fisher, A.C.; Ian Wilson, D.; et al. Surface Morphology and Surface Energy of Anode Materials Influence Power Outputs in a Multi-Channel Mediatorless Bio-Photovoltaic (BPV) System. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2012**, *14*, 12221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Weger, H.G.; Walker, C.N.; Fink, M.B. Ferric and Cupric Reductase Activities by Iron-Limited Cells of the Green Alga *Chlorella Kessleri*: Quantification via Oxygen Electrode. *Physiol. Plant.* **2007**, *131*, 322–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
140. Merino, J.J.; Parmigiani-Izquierdo, J.M.; Toledano Gasca, A.; Cabaña-Muñoz, M.E. The Long-Term Algae Extract (*Chlorella* and *Fucus* Sp.) and Aminosulphurate Supplementation Modulate SOD-1 Activity and Decrease Heavy Metals (Hg⁺⁺, Sn) Levels in Patients with Long-Term Dental Titanium Implants and Amalgam Fillings Restorations. *Antioxidants* **2019**, *8*, 101. [[CrossRef](#)]
141. Sears, M.E. Chelation: Harnessing and Enhancing Heavy Metal Detoxification—A Review. *Sci. World J.* **2013**, *2013*, 219840. [[CrossRef](#)]
142. Reteno, D.G.; Benamar, S.; Khalil, J.B.; Andreani, J.; Armstrong, N.; Klose, T.; Rossmann, M.; Colson, P.; Raoult, D.; La Scola, B. Faustovirus, an Asfarvirus-Related New Lineage of Giant Viruses Infecting Amoebae. *J. Virol.* **2015**, *89*, 6585–6594. [[CrossRef](#)]
143. Andreani, J.; Khalil, J.Y.B.; Sevvana, M.; Benamar, S.; Di Pinto, F.; Bitam, I.; Colson, P.; Klose, T.; Rossmann, M.G.; Raoult, D.; et al. Pacmanvirus, a New Giant Icosahedral Virus at the Crossroads between *Asfarviridae* and Faustoviruses. *J. Virol.* **2017**, *91*, e00212-17. [[CrossRef](#)]
144. Bajrai, L.H.; Benamar, S.; Azhar, E.I.; Robert, C.; Levasseur, A.; Raoult, D.; La Scola, B. Kaumoebavirus, a New Virus That Clusters with Faustoviruses and Asfarviridae. *Viruses* **2016**, *8*, 278. [[CrossRef](#)]
145. Legendre, M.; Bartoli, J.; Shmakova, L.; Jeudy, S.; Labadie, K.; Adrait, A.; Lescot, M.; Poirot, O.; Bertaux, L.; Bruley, C.; et al. Thirty-Thousand-Year-Old Distant Relative of Giant Icosahedral DNA Viruses with a Pandoravirus Morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 4274–4279. [[CrossRef](#)]
146. Andreani, J.; Aherfi, S.; Bou Khalil, J.; Di Pinto, F.; Bitam, I.; Raoult, D.; Colson, P.; La Scola, B. Cedratvirus, a Double-Cork Structured Giant Virus, Is a Distant Relative of Pithoviruses. *Viruses* **2016**, *8*, 300. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
147. Rodrigues, R.A.L.; Andreani, J.; dos Santos Pereira Andrade, A.C.; Machado, T.B.; Abdi, S.; Levasseur, A.; Abrahão, J.S.; La Scola, B. Morphologic and Genomic Analyses of New Isolates Reveal a Second Lineage of Cedratviruses. *J. Virol.* **2018**, *92*, e00372-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
148. Andreani, J.; Khalil, J.Y.B.; Baptiste, E.; Hasni, I.; Michelle, C.; Raoult, D.; Levasseur, A.; La Scola, B. Orpheovirus IHUMI-LCC2: A New Virus among the Giant Viruses. *Front. Microbiol.* **2018**, *8*, 2643. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
149. Souza, F.; Rodrigues, R.; Reis, E.; Lima, M.; La Scola, B.; Abrahão, J. In-Depth Analysis of the Replication Cycle of Orpheovirus. *Virol. J.* **2019**, *16*, 158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Rigou, S.; Santini, S.; Abergel, C.; Claverie, J.-M.; Legendre, M. Past and Present Giant Viruses Diversity Explored through Permafrost Metagenomics. *Nat. Commun.* **2022**, *13*, 5853. [[CrossRef](#)]
151. Colson, P.; La Scola, B.; Levasseur, A.; Caetano-Anollés, G.; Raoult, D. Mimivirus: Leading the Way in the Discovery of Giant Viruses of Amoebae. *Nat. Rev. Microbiol.* **2017**, *15*, 243–254. [[CrossRef](#)]
152. Brandes, N.; Linial, M. Giant Viruses—Big Surprises. *Viruses* **2019**, *11*, 404. [[CrossRef](#)]
153. Aherfi, S.; Andreani, J.; Baptiste, E.; Oumessoum, A.; Dornas, F.P.; dos Santos Pereira Andrade, A.C.; Chabriere, E.; Abrahao, J.; Levasseur, A.; Raoult, D.; et al. A Large Open Pangenome and a Small Core Genome for Giant Pandoraviruses. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 1486. [[CrossRef](#)]
154. Boratto, P.V.M.; Oliveira, G.P.; Machado, T.B.; Andrade, A.C.S.P.; Baudoin, J.-P.; Klose, T.; Schulz, F.; Azza, S.; Decloquement, P.; Chabrière, E.; et al. Yaravirus: A Novel 80-nm Virus Infecting *Acanthamoeba castellanii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117*, 16579–16586. [[CrossRef](#)]
155. de Miranda Boratto, P.V.; Oliveira, G.P.; Abrahão, J.S. “Yaraviridae”: A Proposed New Family of Viruses Infecting *Acanthamoeba castellanii*. *Arch. Virol.* **2022**, *167*, 711–715. [[CrossRef](#)]
156. Moniruzzaman, M.; Martinez-Gutierrez, C.A.; Weinheimer, A.R.; Aylward, F.O. Dynamic Genome Evolution and Complex Virocell Metabolism of Globally-Distributed Giant Viruses. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 1710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Schulz, F.; Alteio, L.; Goudeau, D.; Ryan, E.M.; Yu, F.B.; Malmstrom, R.R.; Blanchard, J.; Woyke, T. Hidden Diversity of Soil Giant Viruses. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 4881. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

158. Bäckström, D.; Yutin, N.; Jørgensen, S.L.; Dharamshi, J.; Homa, F.; Zaremba-Niedwiedzka, K.; Spang, A.; Wolf, Y.I.; Koonin, E.V.; Ettema, T.J.G. Virus Genomes from Deep Sea Sediments Expand the Ocean Megavirome and Support Independent Origins of Viral Gigantism. *mBio* **2019**, *10*, e02497-18. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
159. Dunigan, D.D.; Fitzgerald, L.A.; Van Etten, J.L. Phycodnaviruses: A Peek at Genetic Diversity. *Virus Res.* **2006**, *117*, 119–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Hambly, E.; Suttle, C.A. The Viriosphere, Diversity, and Genetic Exchange within Phage Communities. *Curr. Opin. Microbiol.* **2005**, *8*, 444–450. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
161. Wommack, K.E.; Colwell, R.R. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2000**, *64*, 69–114. [[CrossRef](#)]
162. Yamada, T.; Onimatsu, H.; Van Etten, J.L. Chlorella Viruses. In *Advances in Virus Research*; Academic Press: Cambridge, MA, USA, 2006; Volume 66, pp. 293–336.
163. Legendre, M.; Lartigue, A.; Bertaux, L.; Jeudy, S.; Bartoli, J.; Lescot, M.; Alempic, J.-M.; Ramus, C.; Bruley, C.; Labadie, K.; et al. In-Depth Study of *Mollivirus sibericum*, a New 30,000-y-Old Giant Virus Infecting *Acanthamoeba*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, E5327–E5335. [[CrossRef](#)]
164. Baek, M.; DiMaio, F.; Anishchenko, I.; Dauparas, J.; Ovchinnikov, S.; Lee, G.R.; Wang, J.; Cong, Q.; Kinch, L.N.; Schaeffer, R.D.; et al. Accurate Prediction of Protein Structures and Interactions Using a Three-Track Neural Network. *Science* **2021**, *373*, 871–876. [[CrossRef](#)]
165. Kim, D.E.; Chivian, D.; Baker, D. Protein Structure Prediction and Analysis Using the Robetta Server. *Nucleic Acids Res.* **2004**, *32*, W526–W531. [[CrossRef](#)]

BBM Stock Solutions

1. 25.0 gm NaNO₃ per liter d-H₂O
2. 2.5 gm CaCl₂·2H₂O per liter d-H₂O
3. 7.5 gm MgSO₄·7H₂O per liter d-H₂O
4. 7.5 gm K₂HPO₄ per liter d-H₂O
5. 17.5 gm KH₂PO₄ per liter d-H₂O
6. 2.5 gm NaCl per liter d-H₂O
7. 50.0 gm disodium EDTA, 31.0 gm KOH per liter d-H₂O
8. 4.98 gm FeSO₄·7H₂O per liter acidified H₂O (Acidified H₂O is 999.0 mL d-H₂O + 1.0 mL concentrated H₂SO₄)
9. 11.42 gm H₃BO₃ per liter d-H₂O
10. 8.82 gm ZnSO₄·7H₂O, 1.44 gm MnCl₂·4H₂O, 0.71 gm MoO₃, 1.57 gm CuSO₄·5H₂O, and 0.49 gm Co(NO₃)₂·6H₂O per liter d-H₂O

Note: Stock solution 10 takes weeks for all of the salts to dissolve. Use as suspension until then.

BBM Preparation

to 950 mL of d-H₂O add:

- 10.0 mL of stock solutions 1, 2, 3, 4, 5 and 6
- 1.0 mL of stock solutions 7, 8 and 9
- 2.0 mL of stock solution 10

MBBM Preparation

to 950 mL of d-H₂O add:

- 10.0 mL of stock solutions 1, 2, 3, 4, 5 and 6
- 1.0 mL of stock solutions 7, 8 and 9
- 2.0 mL of stock solution 10
- 1.0 gm of bacto-peptone
- 5.0 gm of sucrose

Tetracycline (filter sterilized, 10 µg/mL final concentration) is added after the media is autoclaved and cool. For MBBM plates, agar is added to 1.5% before autoclaving. For MBBM soft agar (for titering), agar is added to 0.75% before autoclaving.

CHLOROVIRUS HOST GROWTH AND MAINTENANCE

The quality of water used for making the medium can be somewhat critical for the growth of the NC64A. We have traditionally used distilled water that is purified over a general deionizing column (combination organic/mixed bed cartridge, Barnstead/Thermolyne cat. no. D8922) or Milli Q ultrapure water for making the medium.

Note: *Chlorella variabilis* sp. NC64A, *Chlorella heliozoae* SAG 3.83, *Chlorella* sp. ATCC 30562 and *Coccomyxa* C-169 are maintained with MBBM medium. *Micractinium conductrix* Pbi is maintained on FES medium.

For long-term maintenance of these hosts, cells are streaked onto slants (poured with medium + 1.5% agar), grown at 25°C for about 10-14 days, and stored for several months at 4°C. Do not freeze the cultures. You will not be able to regenerate the cultures (unless done under a carefully controlled process such as that used by certain culture collection organizations). New slant cultures should be re-streaked at least every 6 months.

The NC64A should be transferred from the slants to flasks of liquid medium and grown at 25°C with continuous light and shaking. A small volume of medium can be added to the slant to wash the cells from the slant surface and be used to inoculate fresh medium (100-400 ml), grown about 2 weeks, and used for concentrated starter cell culture for sub-culturing. Our growth room (approximately 8 × 12 ft – 2.5 x 3.5 m – ~9 m²) contains three sets of fluorescent lights (cool white), each containing 4-40 watt 48 inch (122 cm) bulbs. This provides sufficient light for growth of the NC64A at a distance of about 2-5 feet (0.6 - 1.5 m) away from the light source.

Chlorella NC64A:

Chlorella NC64A has a doubling time of about **20 hours**. The NC64A should be sub-cultured into fresh MBBM at a low density and grown to a concentration of approximately 1.0-2.0 × 10⁷ cells/mL (late log phase of growth) for use. We use a hemocytometer or Beckman particle counter to count the cells. To attain this late log phase concentration, subculture the NC64A at any of the following concentrations and incubate for the indicated number of days:

- 7.5 × 10⁶ cells/mL, 1 day
- 3.0 × 10⁶ cells/mL, 2 days
- 1.2 × 10⁶ cells/mL, 3 days (ideal)**
- 4.8 × 10⁵ cells/mL, 4 days
- 2.0 × 10⁵ cells/mL, 5 days

Flasks of NC64A to be used for inoculating new cultures ("starter cells") can be set aside and grown until they have reached the stationary phase of growth. These cultures reach a good concentration for "starter cells" one week after the cells reach the 1.0 - 2.0 × 10⁷ cells/mL concentration. These stationary cells are generally in the range of 5.0 - 6.0 × 10⁷ cells/mL. We inoculate flasks on Friday for use on the following Monday, Tuesday and Wednesday. On Mondays, we inoculate flasks for use on Thursday and Friday. **We generally try to incubate cells for a minimum of 3 days.**

We use the following volumes of starter cells to inoculate 500 ml Erlenmeyer flasks containing 350 ml of MBBM:

- On Friday - add 20 ml starter cells/flask for Monday use.
 add 9 ml starter cells/flask for Tuesday use.
 add 4 ml starter cells/flask for Wednesday use.
- On Monday - add 20 ml starter cells/flask for Thursday use.
 add 9 ml starter cells/flask for Tuesday use

Amounts of chlorovirus host cultures to transfer per 350 ml flask (mL of starter culture):

Cell type	3 d ahead	4 d ahead	5 d ahead
NC64A	20	9	4
ATCC 30562	45	25	15
SAG 3.83	25	12	6
Pbi	30	20	15

It is necessary to occasionally start fresh cultures from slants for liquid cultures. **Once every 2 months we start fresh cultures from slants.** We have found that, in particular, if NC64A was continuously sub-cultured in liquid medium, after about five to six months we would start to see abnormal cells as far as cell size and we were getting strange results when we did experiments with them.

Meio de cultura BBM de algas – Irina Agarkova – VAN ETTEN

N° solução	Descrição das SE para 1 L	Adaptação para 200 mL SE	Concentração final 1 L meio BBM (mol/L)
1	25.0 g NaNO ₃ per liter d-H ₂ O	5g NaNO ₃	0,0294
2	2.5 g CaCl ₂ ·2H ₂ O per liter d-H ₂ O	0,5 g CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,00017
3	7.5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O per liter d-H ₂ O	1,5 g MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0003
4	7.5 g K ₂ HPO ₄ per liter d-H ₂ O	1,5 g K ₂ HPO ₄	0,00128
5	17.5 g KH ₂ PO ₄ per liter d-H ₂ O	3,5 g KH ₂ PO ₄	0,00043
6	2.5 g NaCl per liter d-H ₂ O	0,5 g NaCl	0,00042
7	50.0 g disodium EDTA, 31.0 g KOH per liter d-H ₂ O	10 g disodium EDTA, 6,2 g KOH	EDTA 0,01487 KOH 0,00055
8	4.98 g FeSO ₄ ·7H ₂ O per liter acidified H ₂ O (Acidified H ₂ O is 999.0 mL d-H ₂ O + 1.0 mL concentrated H ₂ SO ₄)	0,996 g FeSO ₄ ·7H ₂ O 0,2 mL H ₂ SO ₄	0,0000179
9	11.42 g H ₃ BO ₃ per liter d-H ₂ O	2,284 g H ₃ BO ₃	0,00018
10	8.82 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 1.44 g MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0.71 g MoO ₃ , 1.57 g CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0.49 g Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O per liter d-H ₂ O	1,764 g ZnSO ₄ ·7H ₂ O, 0,288 g MnCl ₂ ·4H ₂ O, 0,142 g MoO ₃ , 0,314 g CuSO ₄ ·5H ₂ O, 0,098 g Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	ZnSO ₄ 0,000061 MnCl ₂ 0,0000145 MoO ₃ 0,00000987 CuSO ₄ 0,000012 Co(NO ₃) ₂ 0,000003

Make growth media and autoclave:

- 1 litre of LB (divide into five 200ml aliquots)
- 200ml of 5x LB
- 1 litre of soft LA (same recipe as normal La but using 0.7% agar, divide into five 200ml aliquots)
- Around 40-60 plates LA plates (usual agar concentration used here)
- 2% mucin solutions (two aliquots of 50ml). To prepare just add mucin to water and autoclave. Since it is very hard to dissolve mucin in water before autoclavation, I suggest that both aliquots are made separately (instead of making 100ml then dividing).

Test the bacterial behaviour in double agar

- Make a double-agar plate to check how the bacterial lawn forms.

- 1) Melt the soft agar bottle in a microwave and move 3ml of media to a glass tube (one per plate to be made). Keep the tubes inside a water bath in 50 degrees Celsius.
- 2) Right before making the plates remove one tube from the water bath, wait for it to cool down (around one minute), add to it 200 microlitres of the target bacterial culture, mix briefly and add to the plate.
- 3) Incubate at room temperature for 1-3 days.

Notes: the culture used in step 2 should be fresh (actively growing bacteria, prepared 1-2 days before). You can make variations of step 2 when working with phages: either mix a phage solution to the 200 microlitres of bacteria and then move the mixture to the soft agar if you want to have full plates with phages. Or make first the soft agar layer with bacteria then add phage solutions as drops to it, for testing many samples at the same time.

Collect samples and filter for phage isolation

- Filter the samples using syringe filters. These samples were collected at the Havbruksstasjonen i Tromsø, from different fish tanks.

- 1) Prepare one sterile 50ml falcon tube for each sample to be used.
- 2) Filter the sample, transferring it from the original tube to the sterile one.
- 3) Keep in the fridge until use next week.

Phage isolation

- For isolating phages you need to prepare enrichment cultures. These are made in liquid and improves the chances of finding phages because: longer incubation time, phages exposed to bacteria actively growing, more phage-bacteria encounters and co-culturing allowing phage adaptation.

1) Prepare enrichment cultures (make one tube for each sample, and test all samples in both your bacteria: 27 samples x 2 bacteria species = 54 tubes). Mark the tubes with bacteria name and sample number. You can make codes: YR3 meaning sample 3 in *Yersinia ruckeri*, for example.

	Enrichment culture
Sample	3.5ml
5x liquid media	1ml
Bacteria culture	0.5ml
Final volume	5ml

Notes: the 5x media is used to give enough nutrients for the bacteria to grow (it gets diluted to 1x). The bacteria cultures should not be too old: usually 1-2 days old cultures are fine. Pipet first the 5x liquid media, then the sample, and finally the bacteria (thus avoiding adding the bacteria to concentrated media or to pure water).

2) Incubate at room temperature under agitation and sample two days later. Samplings can be made at any time point, but usually one sampling after 48h is enough to detect phage presence.

Screening the enrichment cultures for phages.

- Now you collect aliquots of the enrichment cultures and add them as drops to double-agar plates to test for phage presence.

1) Transfer a small fraction of each of your enrichment cultures to a clean Eppendorf (200 microlitres is enough, use one Eppendorf for each enrichment culture, mark with the enrichment code).

2) Prepare double-agar plates using your bacteria. You will have 27 samples, so you can prepare 3 plates for each species and test 9 samples per plate. Divide your plates in a 3x3 grid by marking them with a pen, and write the enrichment code in each square.

3) Briefly centrifuge the eppendorfs to pellet the cells (2 minutes at full speed in a bench centrifuge is enough). After centrifugation be careful not to disturb the pellet.

4) Add a 10 microliter drop of each sample to the designated space in the plates.

5) Incubate at room temperature until phage plaques appear. Usually 1-3 days.

IMPORTANT: Be careful not to have one drop merging with others: space well the drops and avoid moving the plates after the inoculation. Save the eppendorfs for now in the fridge. We can go back to them to recover the phages next week.

Notes: pelleting the cells avoids growth of colonies inside the drops. Filtering would be best, but it is too costly and hard to do for small volumes.

Plaque purification

- After a phage is found, it is useful to make three rounds of plaque purification. It helps for adapting the phage to the host strain and also avoids problems of having mixed phages in the same stock. Plaque purification consists of diluting the phage then making double agar plates with the dilutions (passage 1). Then, one plaque is picked and the process repeated twice (passage 2 and 3). After passage 3 a phage stock can be prepared.

- 1) Starting from the right sample prepare a serial dilution. Use eppendorfs and 100 microlitres as final volume. Prepare 0, -1, -2, -3. For **passage 1** you will use the enrichment sampling as starting material.
- 2) Add 200 microlitres of the right bacteria to each dilution.
- 3) Use the dilutions to make double agar plates (one plate for each dilution).
- 4) Incubate the plates (1-5 days, until plaques appear). Check plaque morphology (size, turbidity, borders) and decide how many plaques to collect.
- 5) Pick up a plaque with a pipet tip, resuspend it in 100 microlitres of LB. For **passages 2 and 3** you will use the plaques collected.
- 6) Make a serial dilution and repeat steps 2-4.

Notes: You will not add drops to these double agar plates. Since you mixed the bacteria and phage for making the plates, phage plaques will appear spread over the plate after incubation. The plates made for passage 3 will be used to prepare your phage stocks.

Alternative method to test for phage presence in a sample

This method can be used to quickly check phage presence after a sample has some lytic effect. The principle is mixing the suspected sample with the host bacterium and then adding a drop of the mixture in a plate. Over time the bacteria will grow as a full colony (if no phage is present) or do not grow / grow poorly (if a phage is present).

- 1) Prepare a dilution series of your samples (undiluted, -1, -2, -3) in eppendorfs. Since the volumes needed are small, you can use 10 microlitres as final volume. Remember to have one control tube (with 10 microlitres of PBS).
- 2) To the dilutions and the control you add 10 microlitres of your target bacteria (use the host in which you saw lysis against after sampling the enrichment cultures). Be careful to not contaminate the control tubes with phages and not to make a cross-contamination between different phages (change pipet tips whenever necessary).
- 3) Mix the tubes (brief vortexing for example) and add 5 microlitre drops of each dilution and the control to a LA plate. You can fit several drops into one plate.
- 4) Incubate for 1-3 days and see how the bacteria grows comparing the control to the tested samples.

Preparation of phage stocks

This step is used to prepare crude phage stocks that can be stored at -80 degrees (long term preservation) and at +4 degrees (working solutions). Highly purified phages can be obtained by ultracentrifugation, but often it is not needed for building a collection and performing phage characterization experiments.

- 1) From plaques collected after the third passage of the plaque purification procedure, make a serial dilution (0, -1, -2) and prepare one new double agar plate for each dilution.
- 2) Incubate the plates until plaques appear. Choose one plate in which confluency is high.
- 3) Harvest the top agar layer and transfer it to a tube (50ml falcon tube for example). Add 4ml of culture media and vortex the mixture. NOTE: the soft agar layer can be collected with a spreader. Using a disposable one is better, but it is also possible to use a glass one as long as it is sterilized between plates (if making more than one phage at a time). Be careful to wait for the glass to fully cool down before using.
- 4) Centrifuge the tubes for 10 minutes. Optimal speed is 11000g, but here in the lab we can use 9000g.
- 5) Collect the supernatant and filter it using syringe filters. From this step is important to keep the samples sterile.
- 6) After filtration aliquots can be frozen at the -80 freezer (for example, 2x200 microlitres aliquots in cryotubes, no glycerol needed). The rest can be kept at 4 degrees in 15ml falcon tubes, for example.

Phage titration

This is a method to determine the amount of phages in a solution, for example a stock or a sample obtained from an experiment.

- 1) Dilute the phage solution to be titrated. It is often useful to test from undiluted (or -1) to around -8.
- 2) Prepare double agar plates containing the appropriated host.
- 3) Plate the dilutions in 10 microlitres drops.
- 4) Incubate the plates and count the plaques in the appropriated dilution. Use the plaque count to calculate the titre in plaque forming unities per millilitre (pfu/ml).

NOTES: alternatively it is possible to make one plate per dilution, but often titrating in drops is reliable and saves a lot of time and resources. After counting, remember to consider the volume plated and the dilution factor before expressing the titre in pfu/ml: number of plaques counted x 100 x inverse of the dilution used. A "good" phage stock will have over 10^{10} pfu/ml, and if so is suitable for DNA extraction.