



**UNIVERSIDADE FEDERAL FLUMINENSE  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**DETECCÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VIRUS HALÓFILOS NA LAGOA  
VERMELHA, RJ.**

**LORENA DA GRAÇA PEDROSA DE MACENA**

**Niterói**

**2016**

**LORENA DA GRAÇA PEDROSA DE MACENA**

**DETECCÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VIRUS HALÓFILOS NA LAGOA  
VERMELHA/RJ.**

Monografia de conclusão de curso de graduação apresentada na Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel, modalidade Biologia Marinha, em Ciências Biológicas.

Orientadoras: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup>. Mirian Araújo Carlos Crapez

**Niterói,**

**2016**

**LORENA DA GRAÇA PEDROSA DE MACENA**

**DETECCÃO E QUANTIFICAÇÃO DE VIRUS HALÓFILOS NA LAGOA  
VERMELHA/RJ.**

Monografia de conclusão de curso de graduação apresentada na Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel, modalidade Biologia Marinha, em Ciências Biológicas.

Aprovada em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – GCM - UFF (Presidente)

---

Prof. Dr. Roberto Campos Villaça - GBM - UFF (Membro)

---

Dr<sup>a</sup>. Juliana Eymara Fernandes Barbosa de Paula - Encarregada da divisão de zona costeira e AJB da Superintendência de meio ambiente da diretoria de portos e costa - Marinha do Brasil (Membro)

---

Ma. Priscila Santana Pereira – Aj. Da Assessoria de Gestão Ambiental da Base Naval do Rio de Janeiro - Marinha do Brasil (Membro Suplente/Revisor)

Niterói,

2016

## ATA DE AVALIAÇÃO DE MONOGRAFIA

Monografia apresentada ao Curso de Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal Fluminense como requisito parcial para obtenção do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas – Modalidade: Biologia Marinha.

Aos dezoito dias do mês de março de dois mil e dezesseis, às dez horas, na sala 01 do Bloco C do Instituto Biomédico, da Universidade Federal Fluminense, reuniu-se a banca examinadora, constituída pelos professores Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão (presidente), Roberto Campos Villaça (examinador) e Juliana Eymara Fernandes Barbosa de Paula (examinadora), para avaliação da monografia de final de curso da aluna **LORENA DA GRAÇA PEDROSA DE MACENA**, matrícula UFF 410.44.076, intitulada “**Detecção e quantificação de vírus halófilos na Lagoa Vermelha/RJ**”, orientada pelas professoras Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão e Mirian Araújo Carlos Crapez, que após apresentação foi julgada e aprovada com média final dez (10,0).

Niterói, 18 de março de 2016.

Banca Examinadora:

Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão Nota final 10,0  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão – UFF

Roberto Campos Villaça Nota final 10,0  
Prof. Dr. Roberto Campos Villaça – UFF

Juliana Eymara Fernandes Barbosa de Paula Nota final 10,0  
Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Juliana Eymara Fernandes Barbosa de Paula – DPC/MB

Dedico a todos que me incentivaram nesta caminhada  
e me auxiliaram nesta conquista.

## AGRADECIMENTOS

A minha mãe, Valéria Pedrosa, meu exemplo de persistência e coragem. Nos momentos de maior cansaço, me deu um afago, um incentivo para continuar e superar as dificuldades.

Ao meu pai, Luiz Macena, que sempre me incentivou nos estudos, a fazer o que amo e nunca desistir da Biologia Marinha. Se hoje eu estou me formando em uma Universidade de renome e em um curso que eu amo é graças ao seu apoio em querer o melhor para mim!

Aos meus avôs, tios, prima e irmã - Regina, Aldir, Renato, Rose, Jarbas, Leila, Bruna e Luna, que contribuíram de forma a me sustentar nesse trajeto diário, que compraram junto comigo o meu sonho e com orgulho falavam para todos que eu estava cursando Biologia na UFF.

Ao Flavio Peçanha, amigo, namorado e companheiro. Acompanhou de perto todo o percurso da faculdade, com palavras e gestos que me incentivaram a prosseguir com coragem e determinação. Obrigada pela paciência! Seu amor me ajudou a chegar onde estou (Te amo!).

Aos amigos do ciclo básico: Karina Gonçalves, Gabriela Silva, Gabriela Góes e Stella Manes. Obrigada pelas risadas, pelas apresentações de seminário, por iniciarem minha vida acadêmica da forma mais feliz possível, pelas palavras amigas, pelo apoio, com vocês eu ri, briguei e chorei. Obrigada por participarem da minha história, amo cada uma de vocês.

A Layanne Coutinho e Hanna Zuchi, minhas "best room-mates", que me aturaram em todos os momentos!

A minha orientadora, Izabel Paixão, obrigada por ter aceitado me orientar desde 2012, agradeço pelo aprendizado transmitido e principalmente por ter acreditado no meu potencial. Serei sempre sua fã!

A minha orientadora, Miriam Crapez, pela atenção, carinho e acolhimento em seu laboratório. Obrigada por sempre tirar um tempinho para me auxiliar nos momentos de desespero e dúvidas!

A Juliana Eymara e Priscila Pereira, pois foi um prazer imenso ter sido aluna de iniciação científica de vocês, só tenho a agradecer pela atenção, risadas, carinho, puxões de orelha e principalmente pela amizade de vocês, na qual espero nunca perder. O apoio e a

amizade de vocês foram fundamentais para confecção deste trabalho de conclusão de curso. Obrigada por sempre estarem presentes e proativas em me auxiliar, por mais distante que estivessem!

Ao Laboratório de Virologia Molecular e Biotecnologia Marinha, por toda paciência, ajuda e boas risadas. Vocês são os melhores!

A Luíza Pereira e Leonardo Amorim, pela imensa ajuda na confecção dos gráficos e apoio durante os momentos estressantes. Não sei o que seria dos meus resultados de epifluorescência sem vocês!

A empresa D2L Consultoria Ambiental, responsável pelo trabalho de campo e coleta de amostras.

Agradeço ao Instituto de Biologia da UFF por permitir a utilização do Microscópio Eletrônico de Transmissão JEM 1011, pelo suporte técnico e prontidão do biólogo Alan Cesar Nunes de Moraes na operação com o microscópio e fotografias.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade de participar e pelas contribuições pessoais acerca da monografia.

A todos que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito obrigada!

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam e nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem vitória, nem derrota.”

(Theodore Roosevelt)



## RESUMO

Os vírus são as entidades biológicas mais antigas e abundantes da Terra. Graças a sua vasta distribuição geográfica, carregam em seu código genético informações importantes para o estudo da origem da vida. Esses agentes são muito conhecidos por gerarem patologias em diversos hospedeiros sejam eles microrganismos, invertebrados e vertebrados. Todavia, a partir da década de 40, evidências demonstraram que os vírus possuíam funções ambientais relevantes, influenciando importantes processos ecológicos e biogeoquímicos a nível global, como: a distribuição de espécies ao longo de cadeias tróficas, transferência horizontal de genes entre hospedeiros, ciclagem de nutrientes e até interferências em fluxos de matéria e energia. A dinâmica, distribuição e interações dos vírus ambientais têm sido pouco exploradas até o presente momento, principalmente em sistemas aquáticos hipersalinos de regiões tropicais e sub-tropicais. Portanto, o objetivo principal deste trabalho foi detectar e quantificar vírus halófilos na Lagoa Vermelha, uma lagoa hipersalina localizada no litoral leste Fluminense do Rio de Janeiro, correlacionando à dinâmica viral com fatores físico-químicos, possibilitando melhor caracterização ecológica, compreensão das funções e interações desses organismos em ambientes extremamente salinos. Os resultados obtidos, através de análises ambientais *in situ* e da utilização de técnicas de microscopia como a microscopia de epifluorescência e microscopia eletrônica de transmissão, demonstraram a presença de partículas virais semelhantes às famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae* com elevada abundância ( $10^9$  partículas/mL) e sugerem que ao longo de 30 anos a Lagoa Vermelha tem sofrido intenso assoreamento e degradação na qualidade ambiental, favorecendo dessa forma a proliferação de bactérias heterotróficas e cianobactérias, principais hospedeiros das partículas virais. Devido à importância global geológica e biológica da Lagoa Vermelha, trabalhos como este são de extrema valia como base para futuras investigações do papel viral nesse ecossistema lacustre tão importante.

**Palavras-chave:** Vírus halófilos, Bacteriófagos, Hipersalinidade, Lagoa Vermelha.

## ABSTRACT

The viruses are biologic entities more the oldest and abundante of Earth. Due to its wide geographical distribution, carry in their genetic code important information for study of the origin of life. These agents are very known for generate pathogens in more hosts whether microorganisms, invertebrates and vertebrates. However, since decade 40 evidence has shown that viruses possessed environmental functions relevant, influencing important ecological and biogeochemical processes at global level, as: the species distribution along trophic chains, horizontal gene transfer between hosts, cycling nutrients and ate interference in matter and energy flows. the dynamics, distribution and interactions of environmental virus has been few explored to date, mainly in aquatic systems hypersaline of tropical and sub-tropical regions. Therefore, the main objective this study was to detect and quantify halophilic viruses in Lagoa Vermelha, a hypersaline lake located on the east coast Fluminense of Rio de Janeiro, correlating the viral dynamics of physico-chemical factors, enabling better ecological characterization, understanding the functions and interactions these organisms in environments extremely saline. The results obtained through analysis environmental *in situ* and use of microscopy techniques like epifluorescence microscopy and electron microscopy transmission, demonstrated virus like particles (VLPs) of families *Siphoviridae*, *Myoviridae* and *Podoviridae* with high abundance ( $10^9$  particles/mL) and suggest that along 30 year the Lagoa Vermelha has undergone intense siltation and degradation in environmental quality, favoring thus the heterotrophic bacteria and cyanobacteria proliferation, main hosts of viral particules. Due to the geological world importance and biological Lagoa Vermelha, jobs as this are extremely valuable as base for paragraph future investigations of the role of the virus in dynamic ecosystem in this lacustrine so important.

**Keywords:** Halophilic viruses, Bacteriophage , Hypersalinity, Lagoa Vermelha.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Microscopia eletrônica de Transmissão demonstrando (A) a ameba *Acanthamoeba polyphaga* (a) parasitada por Mimivírus (m), que por sua vez são infectados pelo vírus Sputnik (s) (GAIA *et al.*, 2013). B) Vírus Sputnik (s) rodeando e infectando o Mamavirus (M), que por sua vez, parasita a ameba *Acanthamoeba catellanii* (DESNUES & RAOULT, 2010) ..... 03
- Figura 2.** Ciclo replicativo de bacteriófagos. Adaptado de FEINER *et al.*, 2015 ..... 03
- Figura 3.** Classificação de alguns bacteriófagos (membros da ordem Caudovirales). Adaptado de MURPHY *et al.*, 1995; ACKERMANN, 2007 ..... 05
- Figura 4.** Modelo esquemático da reciclagem de nutrientes e energia durante o Shunt Viral. Adaptado de SUTTLE, 2007 ..... 06
- Figura 5.** Cadeia trófica aquática, enfatizando a alça microbiana, shunt viral e a bomba biológica. Adaptado de WEITZ *et al.*, 2015..... 07
- Figura 6.** Representação percentual da abundância relativa de vírus dsDNA em salmouras com elevada salinidade no Mar Vermelho. Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2015..... 10
- Figura 7.** Localização da Lagoa Vermelha, entre os Municípios de Saquarema e Araruama, RJ (coordenadas: 22°55'S e 42°25'W) ..... 12
- Figura 8.** Localização dos 3 pontos de coleta (vermelho) na Lagoa Vermelha, entre os Municípios de Saquarema e Araruama, RJ. Adaptado de SANTELLI *et al.*, 2006 ..... 15
- Figura 9.** Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos empregados no presente estudo para a pesquisa de halovírus ..... 16
- Figura 10.** Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos necessários para se realizar a filtração e concentração dos vírus halófilos, a partir das amostras da Lagoa Vermelha, por meio do método de adsorção-eluição em membranas polarizadas, conforme descrito por Katayama *et al.*, 2002. Adaptado de Barbosa, 2014..... 20
- Figura 11.** Sistema de filtração de água constituído por (A) Suporte de membrana; (B) Recipiente pressurizado; (C) Bomba de vácuo com manômetros de pressão positiva ou negativa; (D) Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore ..... 21
- Figura 12.** Esquema representativo demonstrando a diluição seriada das amostras de água concentrada para realização da Microscopia de Epifluorescência. .... 22
- Figura 13.** Ciclo Preparação das lâminas para microscopia de epifluorescência. (A) Sistema de filtração, contendo suporte de vidro acoplado em uma bomba a vácuo; (B) Montagem das lâminas; (C) Microscópio invertido de fluorescência Axiops 50, Zeiss ..... 23
- Figura 14.** Demonstração da fórmula para o cálculo da biomassa bacteriana e VLPs, quantificada por meio da técnica de microscopia de epifluorescência. Adaptado de LUEF *et al.*, 2009 ..... 23
- Figura 15.** Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM 1011) ..... 24

<b>Figura 16.</b> Levantamento batimétrico da Lagoa Vermelha .....	26
<b>Figura 17.</b> Avaliação da abundância bacteriana média nos 3 pontos de coleta (LV 1, LV2 e LV 3) da Lagoa Vermelha com a utilização do corante Laranja de Acridina .....	28
<b>Figura 18.</b> Avaliação da abundância viral encontrada com a média entre os resultados obtidos com o corante Sybr Green I nos 3 pontos de coleta LV1, LV2 e LV3 .....	29
<b>Figura 19.</b> Imagem de microscopia de epifluorescência da filtração amostral LV1 indicando distintos micro-organismos encontrados, utilizando-se o corante Laranja de Acridina (A) e o corante Sybr Green I (B) .....	29
<b>Figura 20.</b> Avaliação geral da abundância bacteriana comparada com a abundância viral nos pontos LV1, LV2 e LV3 .....	30
<b>Figura 21.</b> Avaliação pontual da abundância bacteriana comparada com a abundância viral nos pontos LV1, LV2 e LV3 .....	30
<b>Figura 22.</b> Micrografias da análise realizada com microscopia eletrônica de transmissão - 80kV. Amostras LV1, LV2 e LV3, coletadas na Lagoa Vermelha/RJ - Verão de 2014. A) Siphovírus. B) Myovírus. C) Podovírus .....	31

#### LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Identificação dos pontos de coletas e suas respectivas siglas e coordenadas geográficas dos pontos de coleta .....	16
<b>Tabela 2.</b> Parâmetros físico-químicos mensurados <i>in situ</i> no período do verão de 2014, obtidos a partir de 3 pontos de coleta na Lagoa Vermelha/RJ.....	25
<b>Tabela 3.</b> Concentração de nutrientes da coluna d'água nos pontos amostrados na Lagoa Vermelha/RJ .....	27
<b>Tabela 4.</b> Concentração de pigmentos fotossintetizante da coluna d'água nos pontos amostrados na Lagoa Vermelha/RJ.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem, percentual
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µg/L	Micrograma por litro
µL	Microlitro
µm	Micrometro
µM	Micromolar
a.C	Antes de Cristo
AB	Abundância bacteriana
AO	Corante Laranja de Acridina
AP20	Membrana de microfibra de vidro
APA	Área de Proteção Ambiental
AV	Abundância viral
CE	Condutividade elétrica
Chl-a	Clorofila-a
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
Cu <sup>++</sup>	Íon Cobre
d.C	Depois de Cristo
DMS	Dimetilsulfureto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Feo-a	Feofitina-a
GPS	Sistema de posicionamento global
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ácido Sulfúrico
HAWP	Membrana de éster de celulose mista, hidrófila
HAWP	Membrana de éster de celulose mista, hidrófila
HCl	Ácido Clorídrico
ICTV	Comitê Internacional de Taxonomia Viral
INEA	Instituto Estadual do Ambiente
Kb	Quilobases
km <sup>2</sup>	Quilômetro quadrado
Kv	Quilovolts

L .....	Litro
LV1 .....	Ponto de coleta 1
LV2 .....	Ponto de coleta 2
LV3 .....	Ponto de coleta 3
M .....	mol
MEP .....	Microscopia de epifluorescência
MET .....	Microscopia eletrônica de transmissão
mL .....	Mililitro
mL/min .....	Mililitro por minuto
mM .....	Milimolar
MOD .....	Matéria orgânica dissolvida
mS/cm .....	Unidade de condutividade elétrica (Milisimens por centímetro)
mV .....	Milivolts
N .....	Unidade de normalidade
NaCl.....	Cloreto de Sódio
nm .....	nanômetro
N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> .....	Íon amônio
N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Íon Nitrito
°C .....	Graus Celsius
OD .....	Oxigênio dissolvido
ORP .....	Potencial de oxi-redução
pH .....	Potencial hidrogeniônico
P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> .....	Íon fosfato
PT .....	Fósforo total
RNA .....	Ácido ribonucleico
rpm .....	Rotações por minuto
S .....	Sul
s .....	Unidade de salinidade
STD .....	Sólidos totais dissolvidos
SY .....	Sybr Green I
UFF .....	Universidade Federal Fluminense
UNT .....	Unidade de turbidez
VLPs .....	Virus like particles (Partículas Semelhantes a Vírus)
W .....	Oeste

## SUMÁRIO

Resumo .....	IX
Abstract .....	X
Lista de ilustrações .....	XI
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos .....	XIII
1. Introdução .....	1
1.1 Histórico da virologia humana e ambiental .....	1
1.2 Vírus aquáticos e sua importância ambiental .....	4
1.3 Interações vírus-hospedeiros .....	8
1.4 Ambientes hipersalinos no mundo e vírus halófilos .....	8
1.4.1 Área de estudo: Lagoa Vermelha / RJ .....	11
2. Objetivos .....	14
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos específicos .....	14
3. Material e Métodos .....	15
3.1 Amostragem e coleta de água .....	15
3.2 Caracterização ambiental .....	17
3.2.1 Parâmetros físico-químicos .....	17
3.2.1 Batimetria .....	18
3.2.1 Análise de nutrientes .....	18
3.2.1 Clorofila-a e feopigmento .....	18
3.3 Filtração e concentração das amostras .....	19
3.4 Análises microbiológicas .....	21
3.4.1 Análise da abundância bacteriana e viral por microscopia de epifluorescência (MEP) .....	21
3.4.2 Análise morfo-estrutural dos halovírus por microscopia eletrônica de transmissão (MET) .....	24

4. Resultados .....	25
4.1 Parâmetros físico-químicos .....	25
4.2 Batimetria .....	26
4.3 Nutrientes .....	26
4.4 Pigmentos fotossintéticos .....	27
4.5 Microscopia de epifluorescência .....	28
4.6 Microscopia eletrônica de transmissão .....	31
5. Discussão .....	32
6. Considerações finais .....	37
7. Referências bibliográficas .....	39
8. Anexos .....	52
8.1 Anexo 1 .....	52
8.2 Anexo 2 .....	53



# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 HISTÓRICO DA VIROLOGIA HUMANA E AMBIENTAL**

Desde os primórdios da humanidade, os vírus já influenciavam a mortalidade e transferência genética da vida na Terra, seja infectando organismos microscópicos, invertebrados e até mesmo os vertebrados, incluindo seres autotróficos ou heterotróficos. Distintos relatos de civilizações antigas indicam a presença de doenças provocadas por vírus em humanos e animais há muitos séculos atrás.

Enfermidades como: a varíola e poliomielite, no Antigo Egito (1500- 1300 a.C); a raiva, caxumba, gripe e herpes, na Grécia Antiga (850-377 a.C); e o sarampo na China (37 – 653 d.C) dentre outras, são exemplos de doenças que geraram pandemias e declínios populacionais ao longo de séculos (WILDY, 1973; HEGENBERG, 1998; ROBBINS & DANIEL, 1997; COSTA, 2007; DALLORA, 2007; SCLIAR, 2007).

A virologia passou a ser estudada pelo homem a partir de 1798, com o naturalista e médico britânico Edward Jenner, que procurava compreender mais sobre a varíola, uma doença que acometia milhares de mortes no mundo e, principalmente, na Europa. E apesar de não saber o agente etiológico da doença, Jenner percebeu que a inoculação da secreção - extraída das pústulas de vacas com varíola bovina - em indivíduos saudáveis, não permitia o aparecimento de sintomas da varíola, dessa maneira suas proposições serviram como base para o desenvolvimento de conhecimentos sobre as vacinas (SMITH, 2011).

Apenas 100 anos após as descobertas de Jenner, o primeiro vírus causador de doenças que não afetam somente o homem, foi identificado pelo cientista holandês Martinus Willem Beijerinck, este agente infeccioso denominado Vírus do Mosaico do Tabaco (TMV) infecta plantas do Tabaco e outros integrantes da família Solenaceae, causando grandes prejuízos a colheitas (BEIJERINCK, 1898; CULVER, 2002).

Os anos posteriores foram marcados por grandes descobertas e avanços tecnológicos, principalmente na área da biologia molecular. O desenvolvimento do microscópio eletrônico foi o estopim para a visualização das “partículas”, posteriormente denominadas vírus, colaborando então para o desenvolvimento de técnicas que permitiam o reconhecimento de outras partículas virais com morfologias distintas uma das outras (HAWKES, 2013).

Sendo assim, em 1917, o primeiro bacteriófago - vírus que infectam exclusivamente bactérias - foi isolado a partir de um *Bacillus* por D'Hérelle e somente em 1946, ZOBELL, identificou o primeiro vírus marinho (um bacteriófago) infectando uma enterobactéria marinha, o qual foi isolado quase 10 anos depois por SPENCER (SEKAR & KANDASAMY, 2013; WITTEBOLE, 2014).

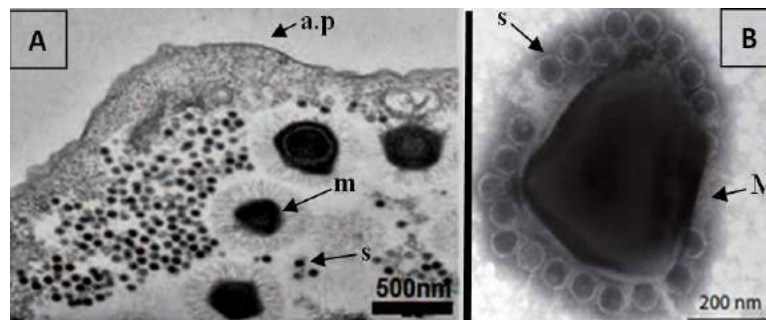
Portanto, a virologia ambiental aquática centrou-se inicialmente na virologia marinha, o que colaborou para modificar a compreensão conceitual do funcionamento e regulação dos ecossistemas aquáticos nas últimas décadas. Posteriormente, os vírus ambientais começaram a ser identificados em diversos ecossistemas, com características únicas e exclusivas (LWOFF, 1957; MIDDELBOE *et al.*, 2008).

Atualmente os vírus são definidos como parasitas intracelulares obrigatórios, que infectam organismos pertencentes aos domínios Archaea, Eubacteria e Eukarya sendo responsáveis até mesmo pela coinfeção com outros vírus - Vírus Sputnik (Figura 1 A e B) - e são classificados por um banco de dados online: Comitê Internacional de Taxonomia dos Vírus (ICTV) que “taxonomizam” todos os vírus já registrados até o presente momento em ordens, famílias, subfamílias, gêneros e espécies de acordo suas propriedades genômicas, físico-químicas, proteicas, biológicas e estratégias de replicação (THOMPSON *et al.*, 2005).

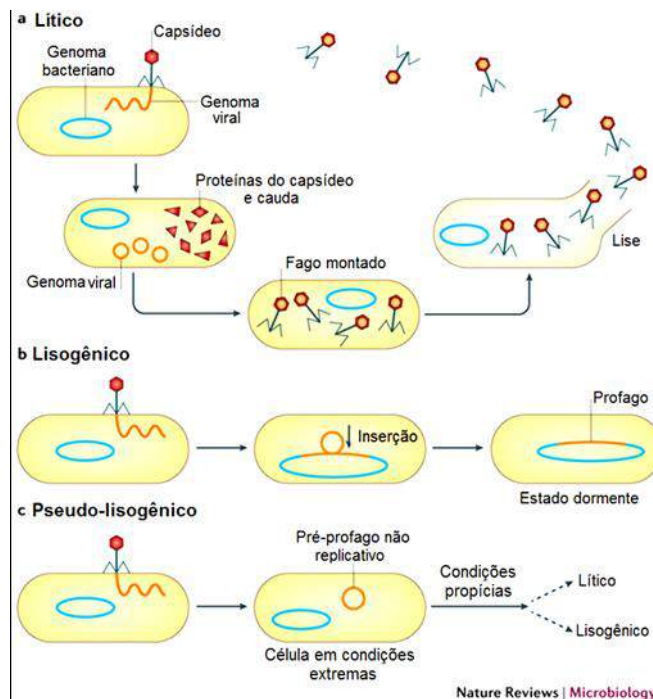
Os vírus são partículas de pequenas dimensões, que variam entre 20 e 800nm, compostos por material genético (DNA ou RNA, de cadeia simples ou dupla), rodeados por proteínas (cápside) e, em alguns, há a presença de um envelope lipídico. São estruturas dependentes de metabolismo celular, funcionando como parasitas durante o ciclo celular do organismo hospedeiro (ABEDON, 2008).

Em ambientes aquáticos, podem existir em duas fases: extracelular e intracelular. Na primeira eles são livres e independentes do hospedeiro, enquanto que na segunda, entram na célula hospedeira e a utilizam para sua replicação. Uma vez dentro da célula hospedeira os vírus, podem seguir dois caminhos: (i) se multiplicar e causar a ruptura da célula hospedeira sendo liberados novamente para o meio (infecção lítica); (ii) permanecer dentro da célula, podendo seu material genético integrar-se ao do hospedeiro ou permanecer na forma plasmidial (por tempo indefinido) até sofrer estímulos como luz ultravioleta ou substâncias

químicas mutagênicas que podem induzir uma mudança para o ciclo lítico (infecção lisogênica) (CHOI *et al.*, 2011). Porém, os bacteriófagos podem ter mais outros caminhos de infecção (Figura 2): (iii) fagos se multiplicam e saem das células por brotamento sem lisá-las (infecção crônica); (iv) apenas uma parte da população se multiplica, a outra parte mantém seu material genético intacto por algumas gerações celulares, retornando a atividade viral lítica ou lisogênica quando os "parâmetros conturbados" no meio são restituídos ou estabilizados (infecção pseudo-lisogênica) (SILLANKORVA, 2004; FORTERRE, 2006;).



**Figura 1.** Microscopia eletrônica de Transmissão demonstrando (A) Ameba *Acanthamoeba polyphaga* (a) parasitada por Mimivírus (m), que por sua vez são infectados pelo vírus Sputnik (s) (GAIA *et al.*, 2013). B) Vírus Sputnik (s) rodeando e infectando o Mamavírus (M), que por sua vez, parasita a ameba *Acanthamoeba catellanii* (DESNUES & RAOULT, 2010).



**Figura 2.** Ciclo replicativo de bacteriófagos. Adaptado de FEINER *et al.*, 2015.

Com os avanços da genética e biologia molecular, hoje sabemos que os genes virais constituem a maior parte da genosfera já descoberta (RAOULT & FORTERRE, 2008), os

vírus passaram a ter grande importância em vários cenários evolutivos, dentre eles na origem do DNA e dos mamíferos. Deixando, portanto, de serem reconhecidos apenas como patógenos e passaram a ter uma importância global a nível ecológico, na transferência horizontal e vertical genética e na estruturação de comunidades. Teoricamente, todos os organismos celulares são susceptíveis a infecções, grande parte das vezes, por mais de um tipo de vírus, o que significa que os vírus serão, provavelmente, os agentes biológicos mais diversificados existentes na Terra.

## 1.2 VÍRUS AQUÁTICOS E SUA IMPORTÂNCIA AMBIENTAL

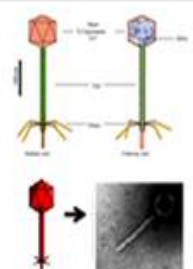
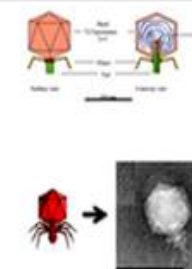
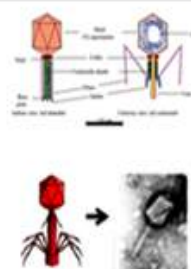
Os avanços na virologia ambiental aquática ocorreram após a década de 1960, onde diversas metodologias foram criadas ou remodeladas colaborando para a quantificação de partículas virais mais sensíveis e para a identificação desses organismos em diversos ambientes antes inexploráveis (HURST, 2000).

Os vírus aquáticos são partículas pequenas e sem metabolismo próprio, necessitando parasitar outros organismos a fim de se multiplicarem. Em ecossistemas aquáticos os vírus estabelecem ciclos de infecção lítica, lisogênica, pseudo-lisogênica e raramente crônica (JACQUET *et al.*, 2010).

Atualmente, são considerados reservatórios da maior diversidade genética em ecossistemas áqueos, sendo sua ocorrência e distribuição presentes nos mais distintos ambientes - marinhos, lacustres, fluviais, cavernosos em estromatólitos, recifes, pântanos naturais, fumarolas submarinas, sedimentos, hipersalinos do hemisfério norte, sedimentos vulcânicos, esteiras microbianas, nos Polos Ártico e Antártico - sendo considerados os agentes biológicos mais abundantes, mensurados em cerca de 10 a 100 milhões de partículas virais por mililitro de água doce ou marinha, representando uma quantidade de carbono equivalente a encontrada em 75 milhões de baleias azuis (BERGH *et al.*, 1989; FUHRMAN & SUTTLE, 1993; ORTMANN *et al.*, 2002; PATTEN *et al.*, 2006; VENTOSA *et al.*, 2006; SUTTLE, 2007; BRUSSAARD *et al.*, 2008; DANOVARO *et al.*, 2008; DESNUES *et al.*, 2008; JACKSON & JACKSON, 2008; PATTEN *et al.*, 2008; PEDUZZI & LUEF, 2008; CLASEN & SUTTLE, 2009; DANG *et al.*, 2011; BREITBART, 2012).

Os bacteriófagos, principalmente da ordem Caudovirales (Figura 3), detém grande destaque na virologia aquática. Atualmente são descritos como o maior grupo de vírus de genes na biosfera - onde as famílias *Siphoviridae*, *Podoviridae* e *Myoviridae* compõem respectivamente em torno de 50, 19, e 18% da diversidade total de vírus em ambientes

aquáticos (WOMMACK & COLWELL, 2000). Devido a sua grande abundância, a maioria dos estudos na área da virologia ambiental se concentra nos fagos, em suas dinâmicas ecológicas e abundância intra e extracelular (SEKAR & KANDASAMY, 2013).

Caudovirales			
FAMÍLIA (MORFOTIPO)	Siphoviridae	Podoviridae	Myoviridae
ÁCIDO NUCLEICO	dsDNA	dsDNA	dsDNA
PARTICULARIDADES	Cauda não contrátil longa	Cauda não contrátil curta	Cauda contrátil
TAMANHO DO CAPSÍDEO	60 nm	60 nm	50 – 110 nm
CAPSÔMEROS	72	72	152
TAMANHO DO GENOMA	50 Kb	40 – 42 Kb	33 – 244 Kb
SIMETRIA	T7	T7	T13 e Q21
MORFOLOGIA			

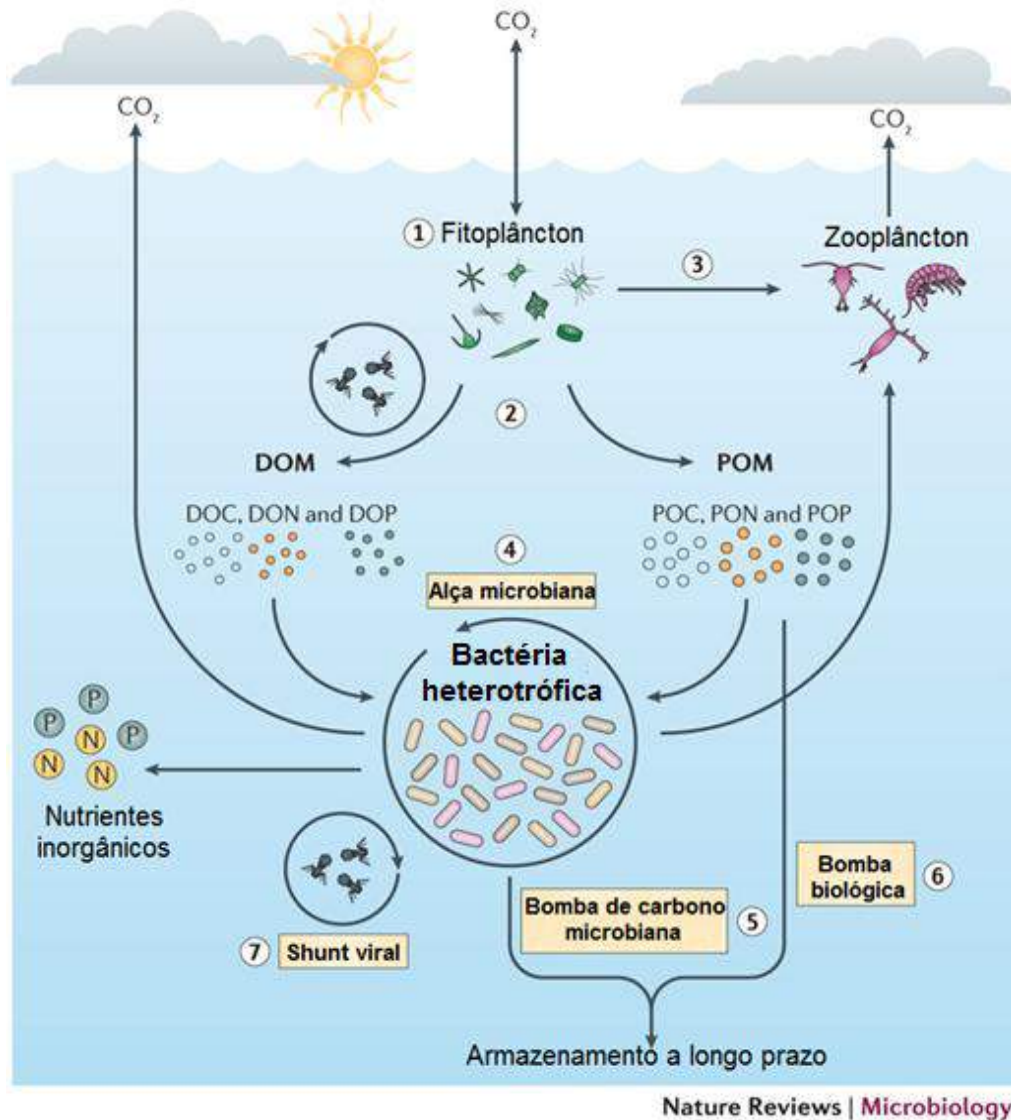
**Figura 3.** Classificação de alguns bacteriófagos (membros da ordem Caudovirales). Adaptado de MURPHY *et al.*, 1995; ACKERMANN, 2007.

O interesse pelo papel ecológico dos vírus nos ambientes aquáticos se iniciou quando BERGH e colaboradores (1989) elucidaram que as partículas virais excedem a abundância das bactérias em pelo menos uma ordem de grandeza. Assim, os vírus deixaram de ser considerados, exclusivamente, agentes patogênicos e passaram a ser reconhecidos como reguladores da abundância e diversidade genética de diversos organismos (ROHWER & THURBER, 2009).

Portanto, devido a essa super abundância os vírus atuam como um fator controlador da abundância de diversos organismos, evitando ou estimulando que espécies mais competitivas crescessem em excesso. Podendo, por exemplo, extinguir rapidamente florações (ou *blooms*) fitoplantônicas reduzindo os impactos gerados por esses eventos efêmeros de



reciclado-a na cadeia. Simultaneamente, ocorre também em regiões oceânicas, um aumento na eficiência da bomba biológica de carbono devido à exportação do material recalcitrante e rico em dióxido de carbono para regiões mais profundas (Figura 5).



**Figura 5.** Cadeia trófica aquática, enfatizando a alça microbiana, shunt viral e a bomba biológica. Adaptado de WEITZ *et al.*, 2015.

Além dessas importantes influências ecológicas, existem outras atribuições virais, como: a ciclagem de nutrientes, regulação da biodiversidade bacteriana e algácea, controle de florações, a distribuição de espécies, estímulo da liberação do dimetil sulfato (DMS, um gás que afeta o clima da Terra), transferência genética horizontal e vertical, além de interferências nos fluxos biogeoquímicos de matéria e energia (AZAM *et al.*, 1983; BRATBAK *et al.*, 1994; WOMMACK & COLWELL, 2000; SUTTLE, 2007; BRUSSAARD *et al.*, 2008; ROHWER & THURBER, 2009; JIAO *et al.*, 2010).

Populações aquáticas também podem ser afetadas por infecções virais indiretamente, ou seja, a variação de diversos fatores físico-químicos acaba alterando toda a dinâmica do sistema virioplanctôntico e, conseqüentemente, a dinâmica da população hospedeira. Por isso, é de extrema importância, em estudos na área de virologia ambiental, a mensuração de fatores como: luminosidade, salinidade, temperatura, pH, concentração de oxigênio dissolvido, concentração total de nitrogênio, fósforo e carbono, profundidade, fluxo de nutrientes, entre outros que podem correlacionar-se com a abundância viral (JACQUET *et al.*, 2010; PRADEEPRAM & SIME-NGANDO, 2010). Essas influências confirmam o fato dos vírus serem ativos no ambiente, modulando grandes interferências dos processos ecológicos.

Em 2006 a virosfera global marinha e ambiental passou a ser estudada, e apesar da abundância viral não ultrapassar a biomassa de 90% dos procariotas, os vírus são responsáveis pela lise de 20% a 40% dessa biomassa diariamente (BERGH *et al.*, 1989, SUTTLE, 2005, SUTTLE, 2007). Desse modo, entendemos que a relação da vida na Terra tem sido direcionada por ações dos microrganismos, uma vez que são agentes que atuam de forma decisiva não só na vida humana, mas em toda a ecologia do planeta.

### **1.3 INTERAÇÕES VÍRUS – HOSPEDEIROS**

Os vírus são altamente seletivos quanto a gama de hospedeiros e ao tipo de célula que infectam, podendo infectar: bactérias, cianobactérias, arqueias, protozoários, amebas, fungos, esponjas, micro e macroalgas, crustáceos, cnidários, peixes, tartarugas-marinhas, pinípedes, cetáceos e até mesmo as baleias (PRANGISHVILI *et al.*, 2006; GUIMARÃES, 2013; KÅHRSTRÖM, 2013; KIM, 2013; KOSKELLA *et al.*, 2013; SANTINI, 2013; XIA *et al.*, 2013; CHAVISUTHANGKURA *et al.*, 2014; SIERRA, 2014).

O modo de transmissão, do vírus no meio aquático, é por difusão passiva e sua replicação varia de acordo com o tipo de vírus, no caso dos bacteriófagos ocorre após a adsorção celular através da cauda e das fímbrias caudais. Em alguns casos, proteínas transportadoras são utilizadas como pontos de adsorção e penetração celular, podendo infectar bactérias e produtores primários (ROHWER & THURBER, 2009). Há uma degradação da parede celular, através da lisozima viral, quando vírus infectam arqueias e aqueobactérias, ocorre à injeção do DNA viral no periplasma celular. A próxima etapa segue com a transcrição e tradução dos genes precoces, replicação do DNA genômico, transcrição e tradução dos genes tardios, formação e maturação de novos vírions no citoplasma celular do



hospedeiro e liberação das partículas virais através da lise celular (HULO *et al.*, 2011; SANTANA-PEREIRA, 2014).

#### 1.4 AMBIENTES HIPERSALINOS NO MUNDO E VÍRUS HALÓFILOS

Os ecossistemas hipersalinos estão dispostos em diversas distribuições no mundo, sendo constatados através de processos naturais em lagos, lagoas, desertos de sal e depósitos de sal e artificialmente em salinas (ATANASOVA *et al.*, 2012). Estes sistemas são formados quando há pequena ou ausência da influência dos aportes pluvio-fluvial, por serem geralmente regiões com maior insolação e evaporação.

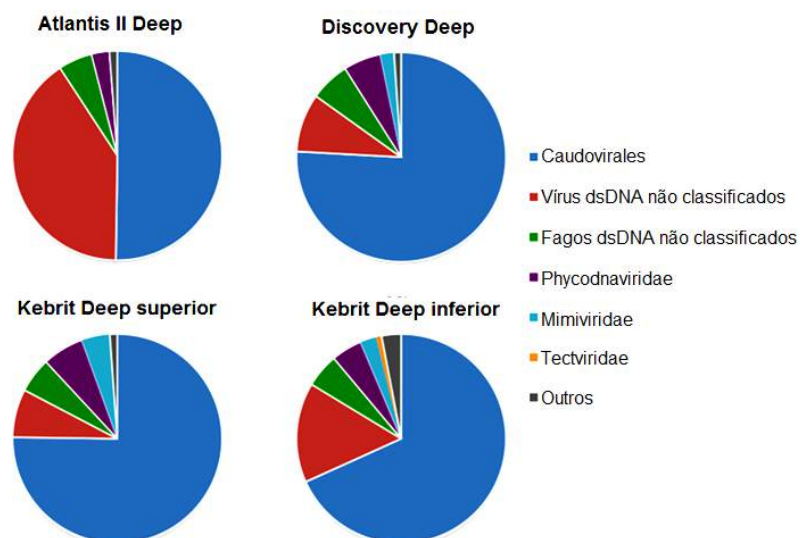
Os organismos que habitam estes locais peculiares são chamados de halófilos extremos (ou extremófilos) e são caracterizados por possuir adaptações metabólicas que garantem sua sobrevivência em locais com salinidades acima de 35 s. Devido a grande resistência as pressões ambientais, estes organismos são amplamente utilizados como objetos de estudos sobre a origem e evolução da vida (OREN, 2002).

Há uma baixa diversidade de seres que sobrevivem a estes ecossistemas, os organismos dominantes comumente encontrados são as arqueias, bactérias e alguns eucariotos halófilos. O principal fator limitante é a elevada salinidade, influenciando diretamente a redução da bacterivoria (consumo de bactérias) por inúmeros organismos, essas particularidades tornam os ambientes hipersalinos tão diferenciados de outros sistemas (PEDRÓS-ALIÓ *et al.*, 2000).

Devido a essa baixa variedade de hospedeiros, os vírus halófilos (também chamados de “halovírus”) realizam constantes infecções garantindo, dessa forma, uma elevada abundância nestes ambientes tão hostis, chegando à ordem de grandeza de  $10^{10}$  partículas por mililitro. Apesar dessa grande biomassa viral, até 2015, foram identificados apenas 10 bacteriófagos halófilos presentes em diversas regiões hipersalinas no mundo (KUKKARO & BAMFORD, 2009; BETTAREL *et al.*, 2010; ATANASOVA *et al.*, 2012).

De acordo ATANASOVA e colaboradores (2012), os morfotipos da ordem Caudovirales - Podoviridae, Myoviridae e Siphoviridae - representam cerca de 50 - 80% de dominância na população viral (Figura 6) infectando arqueias e bactérias dos gêneros *Pseudomonas*, *Salinivibrio*, *Salicola*, *Salisaeta* e *Halomonas* colaborando até mesmo, para um aumento da resistência destes hospedeiros a altas salinidades. Este padrão de dominância pode ser notado em diversas regiões hipersalinas no mundo, como no lago hipersalino Baikal na Sibéria (DUTOVA & DRUCKER, 2013), no lago Rostherne Mere na Inglaterra (HARGREAVES *et al.*, 2013), no Mar Morto (BODAKER *et al.*, 2010), salina nos EUA

(SEAMAN & DAY, 2007); no lago nos EUA (SHEN *et al.*, 2012); na Itália (KUKKARO & BAMFORD, 2009; ATANASOVA *et al.*, 2012); em Israel (AALTO *et al.*, 2012); lago na Califórnia (EUA) (JIANG *et al.*, 2004), dentre outros.



**Figura 6.** Representação percentual da abundância relativa de vírus dsDNA em salmouras com elevada salinidade no Mar Vermelho. Adaptado de ANTUNES *et al.*, 2015.

Assim como outros agentes virais, os halovírus possuem tamanhos e morfologias variadas, sendo encontrados no fentoplâncton (20 a 200nm) e picoplâncton (200nm a 2µm), podendo apresentar genoma RNA, DNA, cadeia simples, dupla, circular ou linear. Os grupos Podoviridae, Myoviridae e Siphoviridae em regiões hipersalinas, apresentam características especiais, como: tamanhos menores e genomas maiores se comparado com fagos de outros ambientes, portanto as dimensões de seus capsídeos variam em torno de 50nm, 90nm e 60nm, respectivamente, assim como o tamanho de seus genomas com 40 a 340 Kb (ATANASOVA, *et al.*, 2012).

Assuntos como interações vírus-hospedeiros e vírus-ambiente tem sido muito estudados, por isso sabemos que vírus halófilos podem perder ou manter sua infecciosidade na presença de baixa ou alta concentração de NaCl e que na concentração de 1M há uma “taxa ótima” de infecção e elevada abundância viral, indicando que adsorção viral não é significativamente influenciada por mudanças nas forças iônicas (SEAMAN & DAY *et al.*, 2007; KUKKARO & BAMFORD, 2009). Conhecimentos como esses devem ser usados para obtenção de valiosas respostas a respeito da biologia dos halovírus em distintos ecossistemas hipersalinos no mundo.

#### 1.4.1 Área de estudo: Lagoa Vermelha / RJ

As lagoas costeiras variam em tamanho e diferenciam-se quanto ao grau de salinidade (ROLAND, 1998). Caracterizam-se por serem ambientes rasos e por sofrerem forte ação dos ventos, fatores estes que geralmente levam a uma maior homogeneidade da coluna d'água (PETRUCIO, 1998).

Existem algumas lagoas hipersalinas no mundo, são encontradas em todos os continentes e sua disposição geográfica varia de acordo com o sua disposição geográfica e clima: árido, semiárido e tropical (VALLENTYNE, 1978; SANTELLI, 1988).

Os sistemas lacustres são conceituados de acordo com como depressões de formas variadas – tendendo principalmente a circulares – com profundidades pequenas e cheia de água doce ou salgada, podendo também ser definidas como lagos de pequena extensão e profundidade. Para esses locais com características únicas existirem, são necessárias condições climáticas e geológicas específicas, como por exemplo: grande acumulação de sais derivados de solos e rochas de bacias de drenagem, ou precipitação de sais oriundos da água do mar, vento com origem terrestre, oriundos de leitos marinhos (graças à ação antrópica de mineração), onde sempre a evaporação torna-se superior a precipitação pluviométrica e a salinidade torna-se igual ou superior a 50 s (SAVENIJE & PAGÈS, 1992).

As lagoas constituem 15% da zona costeira mundial e estão entre os ecossistemas mais produtivos da biosfera, na costa brasileira são encontradas em maior quantidade nos estados do Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (BARROSO & BERNARDES, 1995) e através de pesquisas nesses sistemas lacustres fechados podemos ter uma ideia das condições ambientais do passado (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Sendo assim a Lagoa Vermelha/RJ (Figura 7) constitui-se em uma região de notável interesse científico (geológico, biológico e paleontológico) e econômico devido à existência de estromatólitos carbonáticos holocênicos (sedimentos microbianos formados ao longo das eras geológicas), dolomita e outras condições exclusivas.

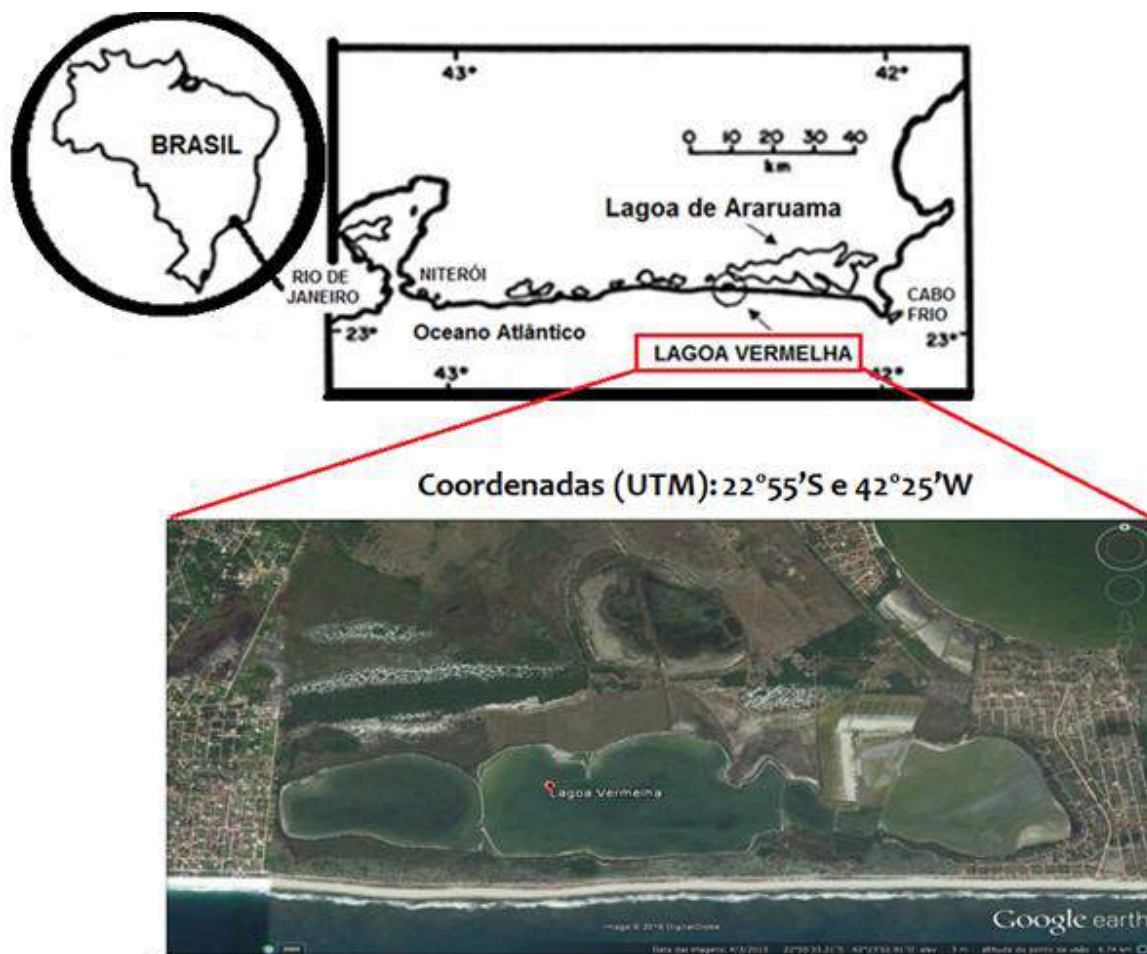
Este corpo aquático costeiro se encontra localizado entre os municípios de Araruama e Saquarema na Região dos Lagos/RJ e está inserido em uma Área de Proteção Ambiental (APA), a Restinga da Massambaba. A Lagoa Vermelha é considerada a mais hipersalina do Estado do Rio de Janeiro (em torno de 100 s), possui 2,5 km<sup>2</sup> de área, 4,3 km de comprimento, 750 metros de largura e em média 1 metro de profundidade (BIDEGAIN & BIZERRIL, 2002), portanto é caracterizada como um ambiente raso e que sofre intensa ação de ventos propiciando uma maior homogeneidade da coluna d'água (PETRUCIO, 1998). Essa Lagoa liga-se a Lagoa de Araruama através de uma vala por dentro de uma dessas salinas.

Além disso, possui núcleos residenciais próximos às margens nos extremos Oeste e Leste e sua margem sul é bem conservada. O clima na região é semiárido, com baixa precipitação e elevada evaporação, o que somado à suas dimensões efêmeras ocasiona grandes variações no seu espelho d'água e na salinidade, em uma escala de salobra a hipersalina (SILVA E SILVA & CARVALHAL, 2005), coincidindo as estações do ano de verão e outono com o período chuvoso e inverno e primavera com o período seco (INMET, 2014).

O nome Lagoa Vermelha deriva da coloração de tapetes de cianobactérias ou esteiras microbianas (algas cianofíceas) que cobrem o fundo em camadas que chegam a atingir um metro de espessura, estando porém ausentes na parte central da lagoa. Encontrando-se duplamente segmentada por marnéis e liga-se a Lagoa de Araruama através de uma vala por dentro das salinas, recebendo água do mar por infiltração e água do subsolo. Fatores como precipitação pluvial e despejo de esgoto são responsáveis pela alteração da salinidade desse ambiente, além da presença de núcleos residenciais próximos às margens oeste e leste. A margem sul está bem conservada e apesar da alteração de salinidade que ocorre esporadicamente pequenos peixes e mariscos conseguem viver na lagoa (SILVA E SILVA & CARVALHAL, 2005).

Lagoas Hipersalinas são caracterizados por elevada concentração de NaCl e outros íons. Um exemplo desta grande concentração de minerais, a Lagoa de Araruama (22°52'22''S e 42°20'35''W), possui maior índice de hipersalinidade no mundo (salinidade média 60 s), segundo ACCETTA (1987) devido à evaporação intensa, ineficiente troca d'água e processos de assoreamento, possuindo altas taxas de produção primária associada ao desenvolvimento de cianobactérias, algas e vegetais faneorgânicos que representam a base da cadeia trófica (KNOPPERS, 1994).

Da mesma forma a Lagoa Vermelha, é considerada a lagoa costeira com a maior salinidade no estado do Rio de Janeiro (em torno de 100 s), isso se deve graças ao seu passado geológico em contato com o mar e a condições climatológicas encontradas na Região dos Lagos, sendo também considerado um laboratório natural para pesquisas envolvendo a evolução da vida na Terra, graças a formação de dolomita estratificada, estromatólitos holocênicos e esteiras microbianas no seu leito e nos tanques das salinas existentes em suas margens (MANSUR, 2013).



**Figura 7.** Localização da Lagoa Vermelha, entre os Municípios de Saquarema e Araruama, RJ (Coordenadas-UTM: 22°55'S e 42°25'W). Adaptado de Google Earth e SANTENTELLI, 1988.

Estudos na área de virologia marinha estão em sua fase inicial e no Brasil ainda não há a caracterização da presença e função das partículas virais em ambientes hipersalinos. Assim, o presente estudo configura-se como ao que se refere à análise quantitativa e qualitativa de vírus halófilos em ecossistemas hipersalinos no Rio de Janeiro/Brasil, como por exemplo, a Lagoa Vermelha. Portanto desde a década de 70, tem se desenvolvido cada vez mais pesquisas na área de virologia ambiental e apesar da presença de inúmeros estudos constatando a presença de vírus em diversos locais, há poucos trabalhos que verifiquem a presença destes organismos em lagoas hipersalinas ainda mais no hemisfério sul do planeta

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo deste trabalho consiste na identificação e quantificação de halovírus (cianófagos da ordem Caudovirales), correlacionando-os com fatores físico-químicos existentes na Lagoa Vermelha. Possibilitando assim, caracterizar a ecologia viral e a melhor compreensão do papel dos vírus e as suas interações e funções nestes ambientes extremos.

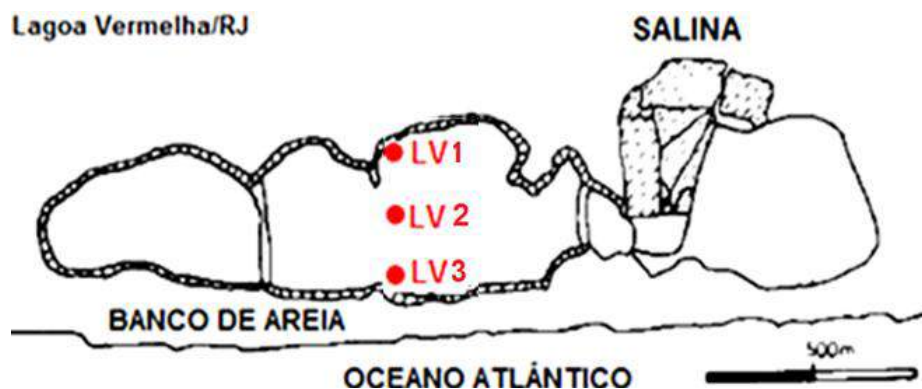
### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- ✓ Analisar a correlação entre os parâmetros físicos e químicos e com a com a abundância viral e bacteriana presente na Lagoa Vermelha;
- ✓ Quantificar a abundância bacteriana e viral, na Lagoa Vermelha, por meio da técnica de Microscopia de Epifluorescência (MEP);
- ✓ Detectar morfo-estruturalmente as partículas virais por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM E COLETA DE ÁGUA

Foram coletadas amostras de água rente ao substrato na Lagoa Vermelha no mês de dezembro de 2014 em 3 pontos amostrais (Figura 8) denominados de LV1, LV2 e LV3 (Tabela 1). O período de coleta foi durante o verão, estação sazonal regida por alta incidência solar, elevadas temperaturas e alta taxa de evaporação, favorecendo em climas semiáridos, a ocorrência de modificações nas concentrações salinas e de nutrientes nos ecossistemas hídricos, criando dessa forma, um ambiente eutrofizado e com elevada salinidade.



**Figura 8:** Localização dos 3 pontos de coleta (vermelho) na Lagoa Vermelha, entre os Municípios de Saquarema e Araruama, RJ. Adaptado de SANTELLI *et al.*, 2006.

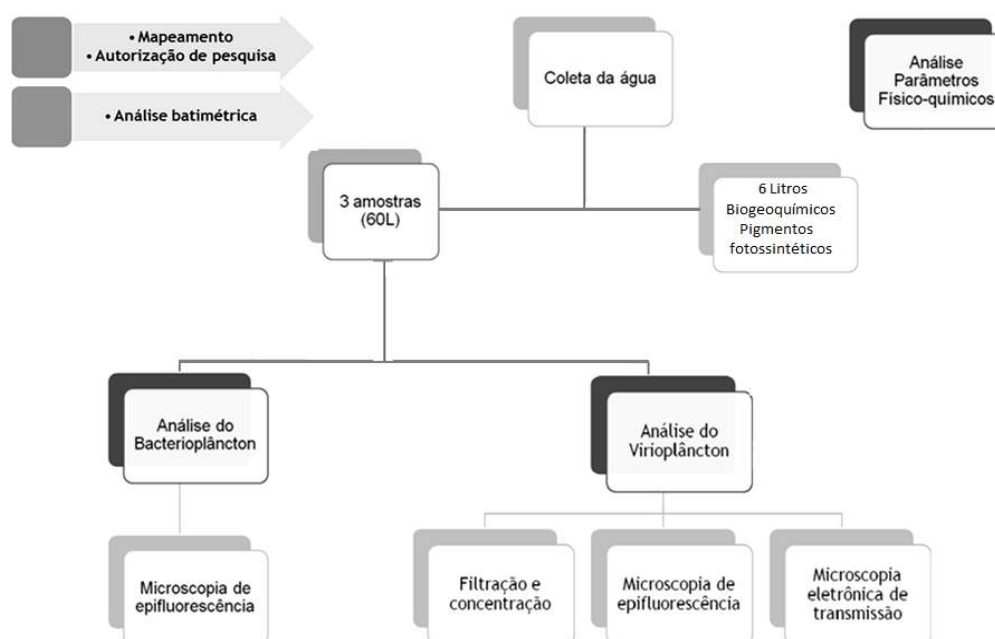
A Lagoa Vermelha está inserida no Parque Estadual da Costa do Sol (PECS) - uma Unidade de Conservação Ambiental. Dessa forma, se torna necessário solicitar autorização (E-07/002.16232/2014) ao Instituto Estadual do Ambiente (INEA) para a realização de coletas e obtenção de dados científicos no local (Anexo 1).

Os pontos de amostragem foram escolhidos de acordo com as características hidrodinâmicas naturais, além de serem semelhante aos utilizados por HOHN *et al.* (1986), na parte central da Lagoa Vermelha.

**Tabela 1:** Identificação dos pontos de coletas e suas respectivas siglas e coordenadas geográficas dos pontos de coleta.

PONTOS DE COLETA	SIGLA	LATITUDE (S)	LONGITUDE (E)
Ponto 1	LV1	74°62'08,9"	76°80'88"
Ponto 2	LV2	74°61'92,2"	76°73'26"
Ponto 3	LV3	74°61'85,3"	76°81'00"

As amostras de água destinadas a etapas de filtração, concentração e análise quantitativa viral e bacteriana, foram obtidas em coletas subsuperficiais (0,5 metros aproximadamente) com auxílio de galões de plástico totalizando um volume de 20L por ponto coletado. Além disso, também foram coletadas amostras de 2L de água, para a realização das análises biogeoquímicas de nutrientes, clorofilas e feopigmentos, estas amostras foram acondicionadas em garrafas escuras de polietileno e levadas ao laboratório, para o processamento das análises, como demonstrado resumidamente na figura 9. Todas as amostras foram processadas na Universidade Federal Fluminense (UFF).



**Figura 9.** Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos empregados no presente estudo para a pesquisa de halovírus.



## 3.2 CARACTERIZAÇÃO AMBIENTAL

### 3.2.1 Parâmetros físico-químicos

Com a utilização do termosalinômetro (YSI30), termômetro convencional e refratômetro (Auto-sal, Guildeline, modelo 8400 A) foi possível mensurar a temperatura e a salinidade da água. Dessa forma, procuramos confirmar os padrões de elevada temperatura e salinidade encontrados em corpos hídricos localizados em regiões semiáridas e hipersalinas.

O potencial hidrogeniônico (pH), parâmetro importante para avaliar as condições químicas do ambiente e dos organismos que nele habitam, foi determinado através de fita de pH (Sigma), em campo, e posteriormente através de um pHmetro de bancada (InoLab) no laboratório (CETESB, 2008).

A transparência da água foi aferida com a utilização de um disco de Secchi (DIGILAB) e dessa forma a transparência da água pôde ser calculada a partir da profundidade de desaparecimento do disco de Secchi, determinando assim os limites e a espessura da camada eufótica, estabelecida entre zero metro (superfície) e a profundidade onde é registrada apenas 1% da luz incidente (ESTEVES, 1988).

O oxigênio dissolvido (OD) foi determinado através do oxímetro (Oxi330i WT), esse parâmetro é considerado um dos mais relevantes na avaliação da trofia ambiental. Níveis inferiores de OD em determinados locais impossibilitam a sobrevivência de diversas espécies aquáticas, além de influenciar bloom de algas e até mesmo proliferação descontrolada de organismos anaeróbicos, fatores estes que colaboram para tornar um ambiente eutrofizado (CETESB, 2008).

A medição da condutividade elétrica (CE), o potencial de óxi-redução (ORP) e os sólidos totais dissolvidos (STD) foram realizados através do condutivímetro (AZ MOD8650), sendo estes diretamente proporcionais às concentrações iônicas e temperatura da água. CE indica a quantidade de sais existentes na coluna d'água e, portanto, representa uma medida indireta ao demonstrar se o ambiente se encontra em estado de poluição, onde em geral, níveis superiores a 0,1 mS/cm indicam ambientes impactados (FARIAS, 2006).

Medidas de ORP são definidas de acordo com a capacidade do substrato receber ou doar elétrons, quando doa facilmente elétrons é chamado de bom agente redutor e aquele que facilmente recebe elétrons é denominado um bom agente oxidante. Quando os elétrons são transferidos cria-se a diferença potencial (ORP), muito utilizada em atividades de saneamento em piscinas, potabilidade e balneabilidade da água, além de qualidade bacteriológica, uma vez

que a sobrevivência destes organismos é dependente deste parâmetro. Águas com valor de ORP igual ou superior a 650 mV encontram-se dentro dos parâmetros bacterianos aceitáveis para água de piscinas e balneabilidade (TREVOR, 2009).

Os sólidos totais dissolvidos (STD) estão intimamente relacionados à OD, ORP, CE e nutrientes da água, e correspondem a toda matéria orgânica e inorgânica de tamanho micrométrico dissolvidas na água, não sendo removidas nem mesmo por filtração (TUNDISI E MATSUMURA TUNDISI, 2008).

### 3.2.2 Batimetria

A análise batimétrica foi realizada por oceanógrafos colaboradores (empresa D2L Consultoria Ambiental), com o GPS, Ecobatímetro (GARMIN) e mapas confeccionados pelo software Surfer 7.0, onde buscou-se medir a profundidade da Lagoa.

### 3.2.3 Análise de nutrientes

A mensuração dos nutrientes inorgânicos totais e dissolvidos foi fundamentada nas técnicas colorimétricas de GRASSHOFF *et al.* (1983), onde os nutrientes: fósforo total (PT), nitrito (N-NO<sub>2</sub>-), fosfato (P-PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>) e amônio (N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) foram quantificados de acordo com curvas de calibração, utilizando soluções padrões para obtenção dos resultados. O aparelho usado para determinação destes compostos foi um espectrofotômetro óptico (Spectronic 20D).

### 3.2.4 Clorofila-a e feopigmento

Para análise de clorofila-a (Chl-a), amostras de água foram coletadas e armazenadas em garrafas de polietileno escuras e mantidas em isopor com gelo. Os frascos com as amostras de água foram transportados até o laboratório onde foi realizado o processo de filtração. Um volume de 200mL de cada amostra foi filtrado em filtros de fibra de vidro Whatman GF/F com poro de tamanho 0,45 µm, com o auxílio de uma bomba de vácuo. Após a filtragem, os filtros foram dobrados com o auxílio de uma pinça, guardados na ausência da luz (envelopes escuros) sendo devidamente etiquetados e conservados sob-refrigeração a -80°C até o momento da extração.

A extração de Chl-a foi realizada com o método espectrofotométrico monocromático utilizando acetona 90% (MERCK) e determinada em espectrofotômetro óptico (Spectronic 20D) segundo SCOR-UNESCO (1966). A mensuração do feopigmento feofitina-a foi

realizada acidificando a amostra, após a 1ª leitura (665 e 750 nm), adicionou-se 100 µL de ácido clorídrico (0,1 M), em seguida as amostras foram submetidas a leitura nos mesmos comprimentos de onda. As concentrações de Chl-a e Feo-a foram calculadas e obtidas em µg/L utilizando equações de acordo com LORENZEN (1967) segundo a metodologia JEFFREY & HUMPHREY (1975).

### 3.3 FILTRAÇÃO E CONCENTRAÇÃO DAS AMOSTRAS

Bacteriófagos possuem carga eletrostática predominantemente negativa ou próximo ao nível de pH neutro quando em meio ambiente (HAMZA *et al.*, 2009). Essa carga eletrostática pode ser modificada para positiva pela redução do pH da água para um valor abaixo do ponto isoelétrico das proteínas do capsídeo viral. Baseado nesta propriedade, os vírus podem ser eficientemente retidos utilizando tanto membranas polarizadas negativamente, quanto positivamente (KATAYAMA *et al.*, 2002; SILVA *et al.*, 2010).

O método de filtração baseado na adsorção-eluição em membranas eletronegativas foi escolhido para o desenvolvimento deste trabalho, devido a sua grande eficácia de concentrar vírus presentes em sistemas hídricos (USEPA 2001; CLESCERI *et al.*, 2005), entretanto, o uso de membranas eletronegativas requer tratamentos prévios da água para propiciar a interação entre o vírus e a membrana. Por isso, estes tratamentos geralmente incluem acidificação da água, modificando a carga do vírus e propiciando interações eletrostáticas entre o capsídeo viral e a superfície eletronegativa das membranas (CHEN *et al.*, 2006; VICTORIA *et al.*, 2009).

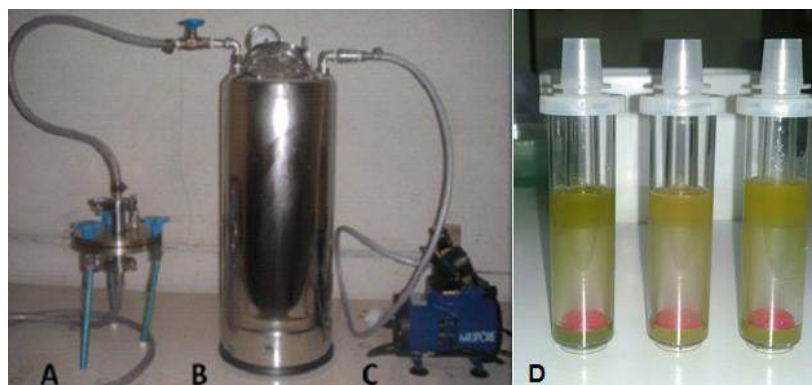
A etapa de ultrafiltração e concentração da água da Lagoa Vermelha foi realizada de acordo com o método descrito por KATAYAMA *et al.* (2002), onde os vírus são adsorvidos no momento da filtração em membranas especiais à base de celulose e carregados eletricamente e por fim concentrados pelo método Centriprep®, todo processo se encontra apresentado no fluxograma da figura 10.



**Figura 10.** Fluxograma demonstrativo da sequência de eventos necessários para se realizar a filtração e concentração dos vírus halófilos, a partir das amostras da Lagoa Vermelha, por meio do método de adsorção-eluição em membranas polarizadas, conforme descrito por KATAYAMA *et al.*, 2002. Adaptado de BARBOSA, 2014.

Antes da transferência dos 20L de amostra de água ao aparelho de filtração acoplado a um sistema a vácuo (Figura 11-A-B-C), o pH da amostra foi ajustado, com HCl 6 N, para 3,5. Em seguida as amostras de 20L foram submetidas ao processo de clarificação que consiste na remoção de resíduos grosseiros por filtração com pré-filtros com fibra de vidro AP-20® (diâmetro de 142 mm, poro com tamanho 0,22  $\mu\text{m}$ , Millipore <sup>TM</sup>) utilizando um sistema de filtração millipore (Millipore, Rio de Janeiro, Brasil) constituído por uma bomba de vácuo (Figura 11-C), um recipiente de pressão (Figura 11- B) e um suporte para a colocação das membranas (Figura 11-A).

Após a primeira etapa de filtração, o volume de 20L que passou pela membrana AP-20®, foi recolhido e novamente filtrado através da HAWP®, uma membrana negativamente carregada (Millipore) com 142 mm de diâmetro e 0,45 $\mu\text{m}$  de porosidade, com um fluxo de 200 mL/min. A membrana foi então lavada com 350mL de uma solução de 0,5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (pH 3,5), para assegurar a retenção das partículas virais. Em seguida procedeu-se a eluição viral utilizando 15 mL de NaOH 1mM (pH 10,5).



**Figura 11.** Sistema de filtração de água constituído por (A) Suporte de membrana; (B) Recipiente pressurizado; (C) Bomba de vácuo com manômetros de pressão positiva ou negativa; (D) Concentrador Centriprep® YM-50, Millipore.

A amostra eluída (15 mL) foi neutralizada com 50  $\mu$ L da solução de 50 mM  $H_2SO_4$  e com 50  $\mu$ L de tampão Tris-EDTA 1 mM 100x (pH 8,0). As partículas virais contidas nos 15 mL foram concentradas através da centrifugação utilizando Centriprep YM 50 (Millipore) (Figura 10-D), proporcionando uma detecção viral mais eficiente. As amostras foram centrifugadas a 5.000 rpm por 10 min a 4°C, obtendo-se a partir de 20 L coletado um volume final de 4 mL.

### 3.4 ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS

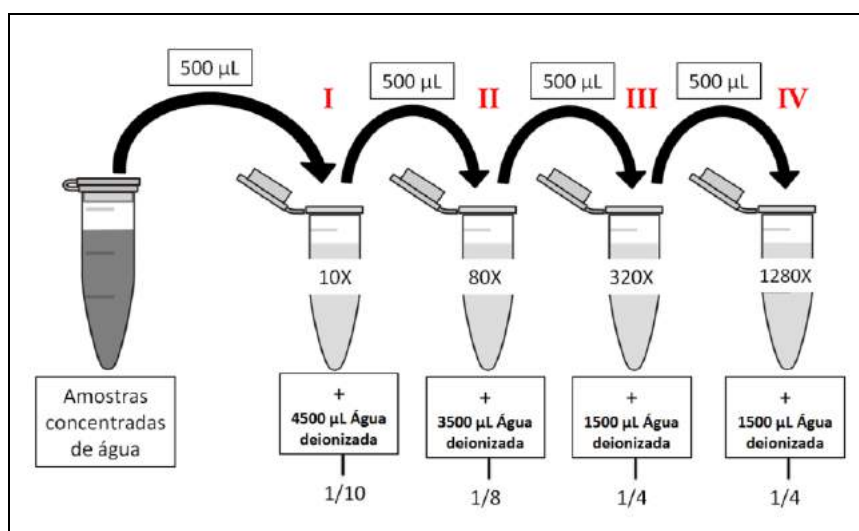
#### 3.4.1 Análise da abundância bacteriana e viral por microscopia de epifluorescência (MEP)

De acordo com o protocolo estabelecido segundo CARLUCCI *et al.* (1986) e KEPNER & PRATT (1994), o número total de bactérias e de Partículas Semelhantes a Vírus (Virus Like Particles - VLPs) foi quantificado diretamente por microscopia de epifluorescência com a utilização de um microscópio de fluorescência invertido, no aumento de 100X (Axiops 50, Zeiss, Filtro triplo Texas Red-Iisotiocianato de fluoresceína-DAPI). Para esta técnica foram utilizados 2 corantes: Laranja de Acridina (AO) (1 $\mu$ g/mL, Sigma) e o SYBR Green I (SY) (Sigma- Molecular Probe, Eugene, OR, USA), e utilizado 500  $\mu$ L de amostras concentradas obtidas pelo método de ultrafiltração e concentração.

A abundância bacteriana foi mensurada através da contagem de marcação com o AO (KEPNER & PRATT, 1994) na concentração de 1  $\mu$ g/mL e para avaliação mais específica dos vírus ou VLPs presentes nas amostras foi utilizado corante SY, pois ele apresenta maior afinidade por DNA dupla fita (LUEF *et al.*, 2009). Sendo assim, foi realizada uma diluição seriada de acordo com a figura 12, onde a primeira diluição foi de 10X (0,5 mL de amostra concentrada para 4,5 mL de água deionizada), a segunda diluição foi de 8X (0,5 mL da

primeira diluição para 3,5 mL de água deionizada), a terceira diluição foi de 4X (0,5 mL da segunda diluição para 1,5 mL de água deionizada) e a quarta diluição foi de 4X (0,5 mL da terceira diluição para 1,5 mL de água deionizada + 0,75µL de Laranja de Acridina + 200 µL de formaldeído 2%). O conteúdo da quarta diluição (diluído 1280 X a partir da amostra inicial) foi filtrado através de membrana (Isopore™ Membrane filters) em policarbonato GTBP, com poro de 0,2 µm e diâmetro de 25 mm, para a marcação feita com AO. Finalizando, a montagem das lâminas é realizada aplicando uma gota de óleo mineral sobre a membrana e adicionando a lamínula (PATEL *et al.*, 2007).

Desta forma, para mensuração da abundância viral foi efetuada a quarta diluição e a filtração, sem adição de corante (1280X). Sendo realizada apenas uma filtração da amostra pura diluída em membrana de Óxido de Alumínio (Anodisc) com porosidade de 0,02µm e diâmetro de 25 mm (Anodisc 25™ - Millipore), e adicionada, em placa de petri estéril, uma gota da solução de SYBR Green I (1:400), onde a membrana Anodisc® contendo a amostra impregnada foi colocada sobre esta gota a fim de realizar a marcação da amostra (FUHRMAN *et al.*, 2007). Após a incubação por 15 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luz, foram montadas as lâminas, conforme citado anteriormente.



**Figura 12.** Esquema representativo demonstrando a diluição seriada das amostras de água concentrada para realização da Microscopia de Epifluorescência.

Em cada análise as membranas foram colocadas em lâminas e fechadas com lamínulas para serem observadas no microscópio de fluorescência com luz azul (Axiops 50, Zeiss, Filtro triplo Texas Red-Iisotiocianato de fluoresceína-DAPI) em aumento de 1000X utilizando óleo de imersão (Figura 13). Foram contados 30 campos aleatórios, onde o produto da contagem

foi inserido em uma equação que avalia a biomassa bacteriana e viral, conforme demonstrado na figura 14 abaixo (LUEF *et al.*, 2009).



**Figura 13.** Preparação das lâminas para microscopia de epifluorescência. (A) Sistema de filtração, contendo suporte de vidro acoplado em uma bomba a vácuo; (B) Montagem das lâminas; (C) Microscópio invertido de fluorescência Axiops 50, Zeiss.

$$\text{Número de cels / cm}^3 = X \cdot A \cdot d \cdot 1 / a \cdot 1 / n \cdot V$$

Onde:

$X$  = número total de células contadas

$A$  = área do filtro (4,90625 cm<sup>3</sup>)

$d$  = diluição (1280 X)

$a$  = área do campo do microscópio (1/a= 3931,745 cm<sup>3</sup>)

$n$  = número de campos contados (1/n= 0,1)

$V$  = volume da amostra filtrada (1/V= 0,2)

Logo:

$$\text{Número de cels/cm}^3 = X \cdot 4,90625 \cdot \text{diluição} \cdot 3931,745 \cdot 0,1 \cdot 0,2 =$$

$$\text{Número de cels/cm}^3 = X \cdot \text{diluição} \cdot 385,802478$$

**Figura 14.** Demonstração da fórmula para o cálculo da biomassa bacteriana e VLPs, quantificada por meio da técnica de microscopia de epifluorescência. Adaptado de LUEF *et al.*, 2009.

As partículas virais contadas foram diferenciadas das bactérias através da análise do tamanho da partícula viral em comparação com célula bacteriana e também pela diferença da intensidade da fluorescência emitida por esses dois microrganismos sob a ação dos corantes (LUEF *et al.*, 2009). O conteúdo filtrado e as membranas analisadas foram armazenados e estocados em ultrafreezer (− 80°C) para futuras análises.

### 3.4.2 Análise morfo-estrutural dos halovírus por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Para o processamento das amostras, por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), 500µL das amostras obtidas a partir do procedimento de adsorção-eluição em membranas polarizadas, foram centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos a 4°C, aliquoteado 250µL do sobrenadante obtido e fixado com glutaraldeído a 2% para a MET. Em um parafilme, foi adicionada uma gota contendo 20 µL de amostra. Após esta etapa foi colocado sobre a gota grades de Cobre ( $\text{Cu}^{++}$  400 mesh), já pulverizadas com carbono, e incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foi feito o processo de secagem da grade por 10 minutos. Imediatamente após, as grades foram lavadas 3 vezes em água deionizada estéril e o excesso de líquido retirado com papel de filtro. As partículas virais aderidas foram contrastadas com acetato de uranila 2%, incubadas por 30 minutos, em seguidas lavadas 3 vezes com água estéril retirando o excesso do líquido com papel filtro, e aguardar 24 horas até a grade estar totalmente seca. Por fim, as grades foram analisadas em microscópio eletrônico (JEOL, JEM1011 – Electron Microscopy) a 80 Kv (Figura 15).

As imagens foram observadas em aumentos de 180.000 a 250.000 vezes, capturadas e analisadas utilizando câmera digital e software. Os vírus foram caracterizados com base na morfologia, tamanho e uniformidade estrutural de acordo com protocolo descrito por KUTTER, *et al.* (2011) e LEE *et al.* (2011).



**Figura 15.** Microscópio Eletrônico de Transmissão (Jeol JEM 1011).



## 4. RESULTADOS

### 4.1 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS

Os resultados físicos obtidos *in situ* na Lagoa Vermelha, no período do verão de 2014, podem ser observados juntamente com suas médias e desvio padrão (DP) conforme demonstrado na tabela 2. Especialmente, os três pontos de coleta apresentaram valores homogêneos independentemente da profundidade coletada, padrões estes característicos de corpos lacustres com pouco fluxo hídrico (baixo hidrodinamismo), intensa mistura da água e ausência de estratificação vertical, devido a grande incidência de ventos e pouca profundidade (TORRES, *et al.*, 2009).

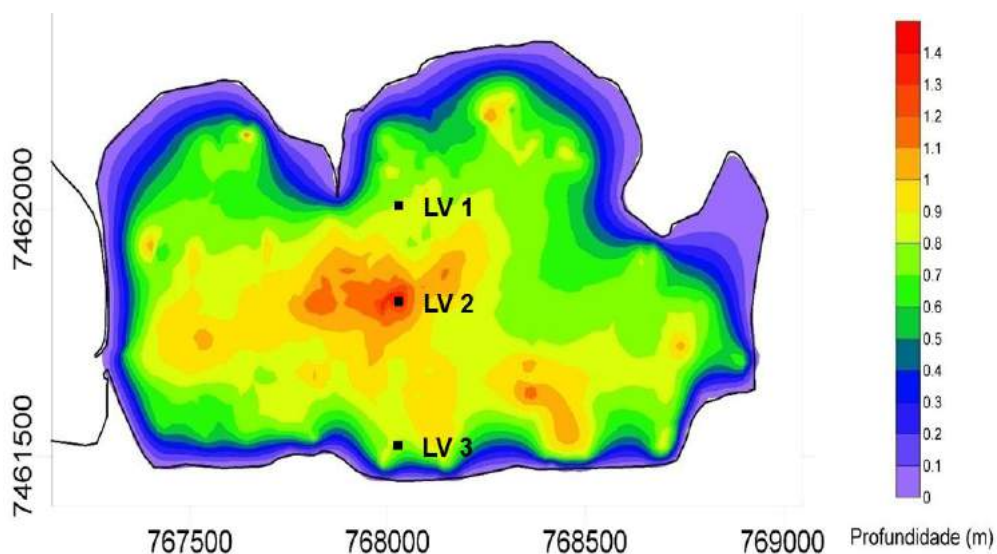
**Tabela 2.** Parâmetros físico-químicos mensurados *in situ* no período do verão de 2014, obtidos a partir de 3 pontos de coleta na Lagoa Vermelha/RJ.

PONTOS AMOSTRAIS	SALINIDADE (s)	TEMPERATURA (°C)	PH	TURBIDEZ (UNT)	O.D. (mg/L)	CONDUTIVIDADE (mS/cm)	ORP (mV)	SÓLIDOS DISSOLVIDOS (ppt)
LV1	> 70	23,5	7,11	14,5	3,04	117,7	83,3	58,8
LV2	> 70	23,2	7,03	15,4	4,84	103,6	91,0	57,16
LV3	> 70	23,3	7,00	11,4	3,75	115,7	88,6	55,3
MÉDIA	> 70	23,3	7,0	13,8	3,9	112,3	87,63	57,09
DP	0	0,2	0,1	2,1	0,9	7,6	3,94	1,75

Os resultados demonstrados na tabela 2 acima, indicam valores médios nos 3 pontos de: salinidade maior que 70 s; temperatura 23,3°C; pH 7,0; turbidez 13,8 unt; oxigênio dissolvido 3,9 mg/L; condutividade 112,3 mS/cm; potencial de oxi-redução (ORP) 87,63 mV e sólidos totais dissolvidos 57,16 ppt.

## 4.2 BATIMETRIA

O levantamento batimétrico identificou que a borda da lagoa possuía até 0,5 metros, a parte média, até 0,8 metros e a maior parte central, 0,9 metros. Somente um pequeno núcleo central possuía profundidades entre 1,0 a 1,4 metros (Figura 16). O Ponto amostral LV1 e LV3 possuem uma profundidade de 0,9 e 0,8 metros, respectivamente. Já o ponto LV2 está inserido na região mais profunda da Lagoa, com profundidade de 1,4 metros.



**Figura 16.** Levantamento batimétrico da Lagoa Vermelha.

## 4.3 NUTRIENTES

Foi observada, especialmente, uma pequena variação nas concentrações de nutrientes (Tabela 3). O ponto de coleta LV1 se destacou com maiores concentrações de amônia ( $\text{N-NH}_4^+$ ), fosfato ( $\text{P-PO}_4^{3-}$ ) e fósforo total (PT), quando comparado-as aos outros pontos de coleta (LV2 e LV3).

A média geral de nitrito ( $\text{N-NO}_2$ ) foi igual a  $0,8 \mu\text{M}$ , o que segundo a Resolução CONAMA nº 357/2005 é muito menor do que o máximo estabelecido para Classe 1, de águas salinas ( $5 \text{ mM} - 0,07 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

As concentrações de amônia variaram de  $2,06$  a  $5,98 \mu\text{M}$  e nitrito de  $0,73$  a  $1,0 \mu\text{M}$ . As formas dissolvidas de fósforo, conhecida como  $\text{PO}_4$  e a concentração de PT variaram de  $0,75$  a  $1,52 \mu\text{M}$  e  $1,32$  a  $4,50 \mu\text{M}$ , respectivamente.

**Tabela 3.** Concentração de nutrientes da coluna d'água nos pontos amostrados na Lagoa Vermelha/RJ.

PONTOS AMOSTRAIS	NUTRIENTES ( $\mu\text{M}$ )			
	N-NO <sub>2</sub>	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	P-PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	PT
LV1	0,73	5,98	1,52	4,50
LV2	1,00	2,06	0,79	1,32
LV3	0,75	3,57	0,75	1,93
Média	0,8	3,9	1,0	2,6
DP	0,1	2,0	0,4	1,7

#### 4.4 PIGMENTOS FOTOSSINTÉTICOS

Os resultados obtidos na análise do pigmento fotossinteticamente ativo clorofila-a (Chl-a) e feofitina-a (Feo-a) se apresentaram heterogêneos nos três pontos de coleta, com média de 28,8 $\mu\text{M}$  (Tabela 4). O ponto amostral LV3 apresentou elevadas concentrações de Chl-a (50,2  $\mu\text{M}$ ) e a menor concentração foi encontrada no ponto LV2 (5,85  $\mu\text{M}$ ).

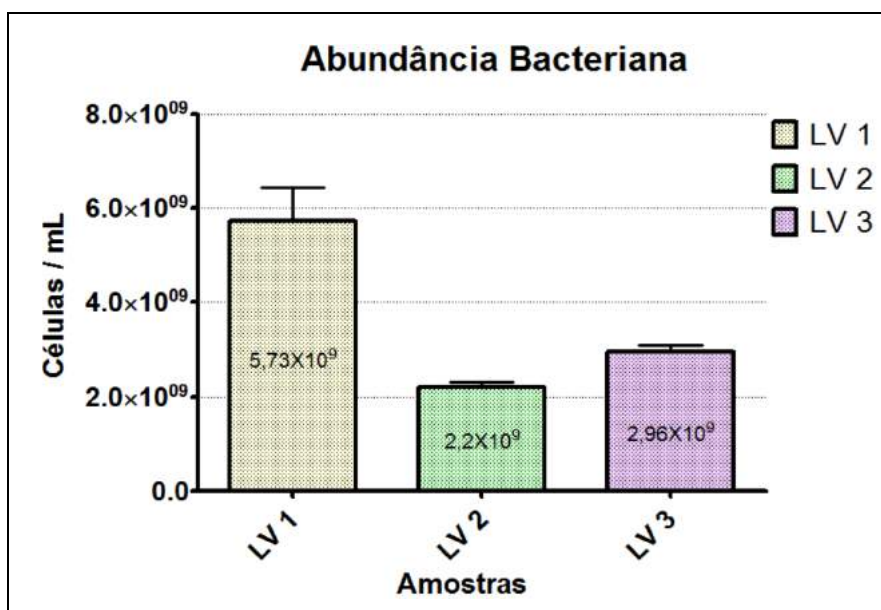
Com relação aos resultados de Feo-a, através da razão Feo-a/Chl-a pode-se observar maior degradação da clorofila-a nos pontos LV2 e LV1, já no ponto LV3 foi constatada pouca degradação da Chl-a.

**Tabela 4.** Concentração de pigmentos fotossintetizante da coluna d'água nos pontos amostrados na Lagoa Vermelha/RJ.

PONTOS AMOSTRAIS	CLOROFILA - A ( $\mu\text{M}$ )	FEOFTINA - A ( $\mu\text{M}$ )
LV1	30,44	18,53
LV2	5,85	4,83
LV3	50,20	7,74
Média	28,8	10,4
DP	22,2	7,2

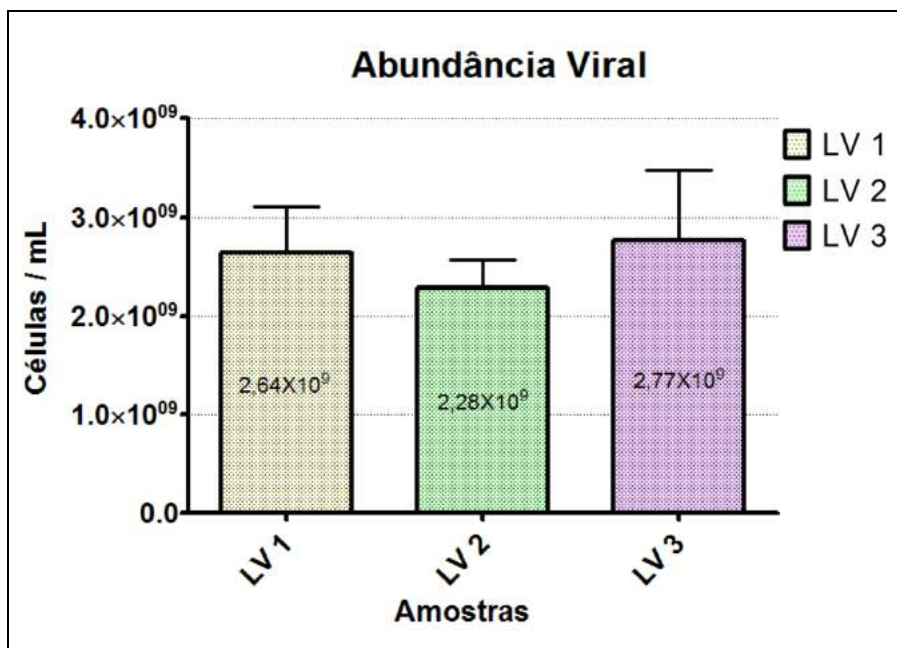
#### 4.5 MICROSCOPIA DE EPIFLUORESCÊNCIA

A análise por microscopia de epifluorescência permite quantificar através da contagem direta o número de bactérias e partículas semelhantes a vírus (VLPs) presentes nas amostras, os valores de abundância bacterianas e virais. A abundância bacteriana (AB) nos três pontos de coleta na Lagoa Vermelha, mensurada através da utilização do laranja de acridina, está representada na figura 17. Analisando-se pontualmente as amostras observamos que a amostra LV1 apresentou o maior valor de AB ( $5,73 \times 10^9$  céls./mL) e LV2 o menor valor de AB ( $2,20 \times 10^9$  céls./mL). Em suma, foram encontrados valores homogêneos de células bacterianas, com a mesma ordem de grandeza em todas as amostras de:  $10^9$  céls./mL (Figura17).



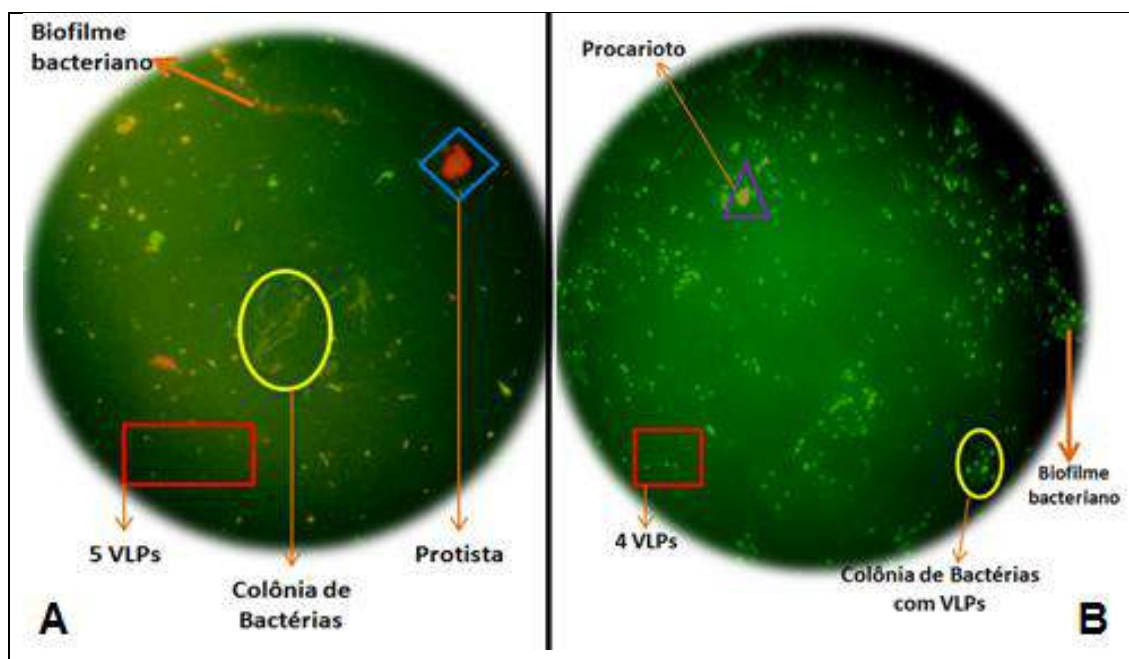
**Figura 17.** Avaliação da abundância bacteriana média nos 3 pontos de coleta (LV 1, LV2 e LV 3) da Lagoa Vermelha com a utilização do corante Laranja de Acridina.

Os resultados obtidos na Abundância Viral (AV) nos três pontos de coleta na Lagoa Vermelha (Figura 18), mensurados com o corante Sybr Green I, demonstram que o ponto LV3 apresentou o maior valor de AV ( $2,77 \times 10^9$  partículas/mL) e o ponto LV2 apresentou o menor valor de AV ( $2,28 \times 10^9$  partículas/mL), porém todas as amostras obtiveram valores de abundância partículas virais com ordem de grandeza em de:  $10^9$  partículas/mL, não apresentando assim heterogeneidade.



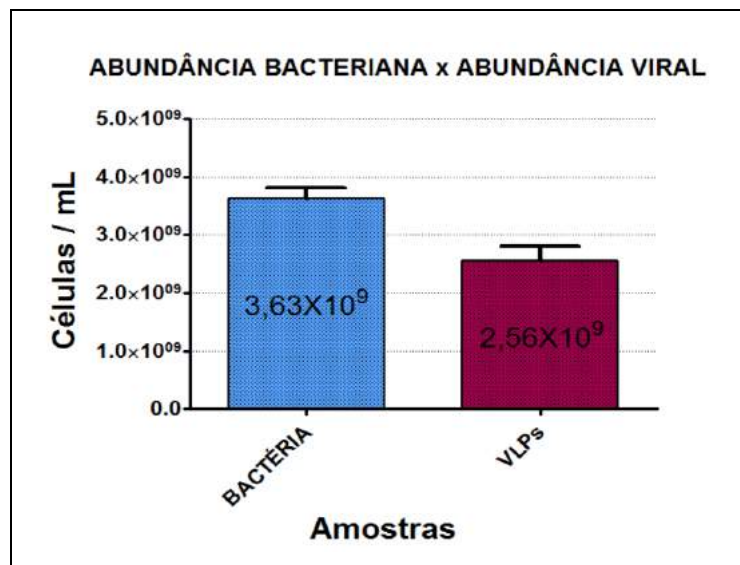
**Figura 18.** Avaliação da abundância viral encontrada com a média entre os resultados obtidos com o corante Sybr Green I nos 3 pontos de coleta LV1, LV2 e LV3.

Nos 3 pontos de coleta foram observadas presenças de organismos planctônicos, mais especificamente protistas, procariotos, partículas semelhantes a vírus (VLPs) e células bacterianas em formato de cocos e bacilos, vivendo livres ou em colônias, além da manifestação de biofilmes (Figura 19).



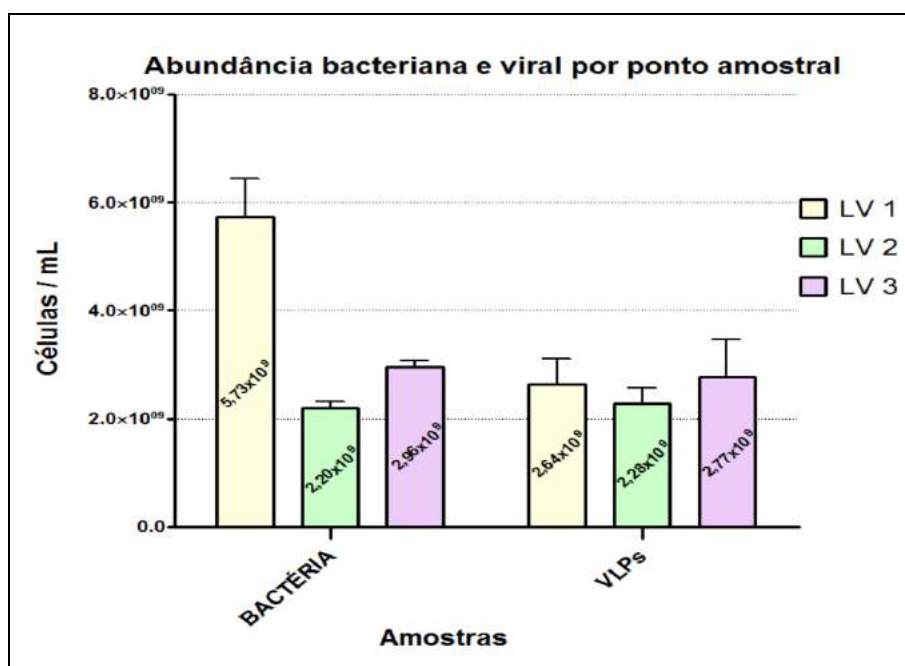
**Figura 19.** Imagem de microscopia de epifluorescência da filtração amostral LV1 indicando distintos micro-organismos encontrados, utilizando-se o corante Laranja de Acridina (A) e o corante Sybr Green I (B).

Buscando avaliar a abundância de organismos bacterianos e virais nos 3 pontos coletados, se constatou uma pequena diferença na relação entre a AB e AV, onde foram observadas 1,4 células bacterianas a mais do que partículas virais (Figura 20).



**Figura 20** - Avaliação geral da abundância bacteriana comparada com a abundância viral nos pontos LV1, LV2 e LV3.

Ao analisar a relação de AB e AV comparando-se com cada ponto coletado, foi observado uma grande semelhança na quantidade de organismos entre os pontos LV2 e LV3, com uma diferença menor que 0,5 células/mL. Porém, o ponto amostral LV1, apresentou uma diferença de aproximadamente 2,2 células bacterianas/mL a mais que VLPs (Figura 21).

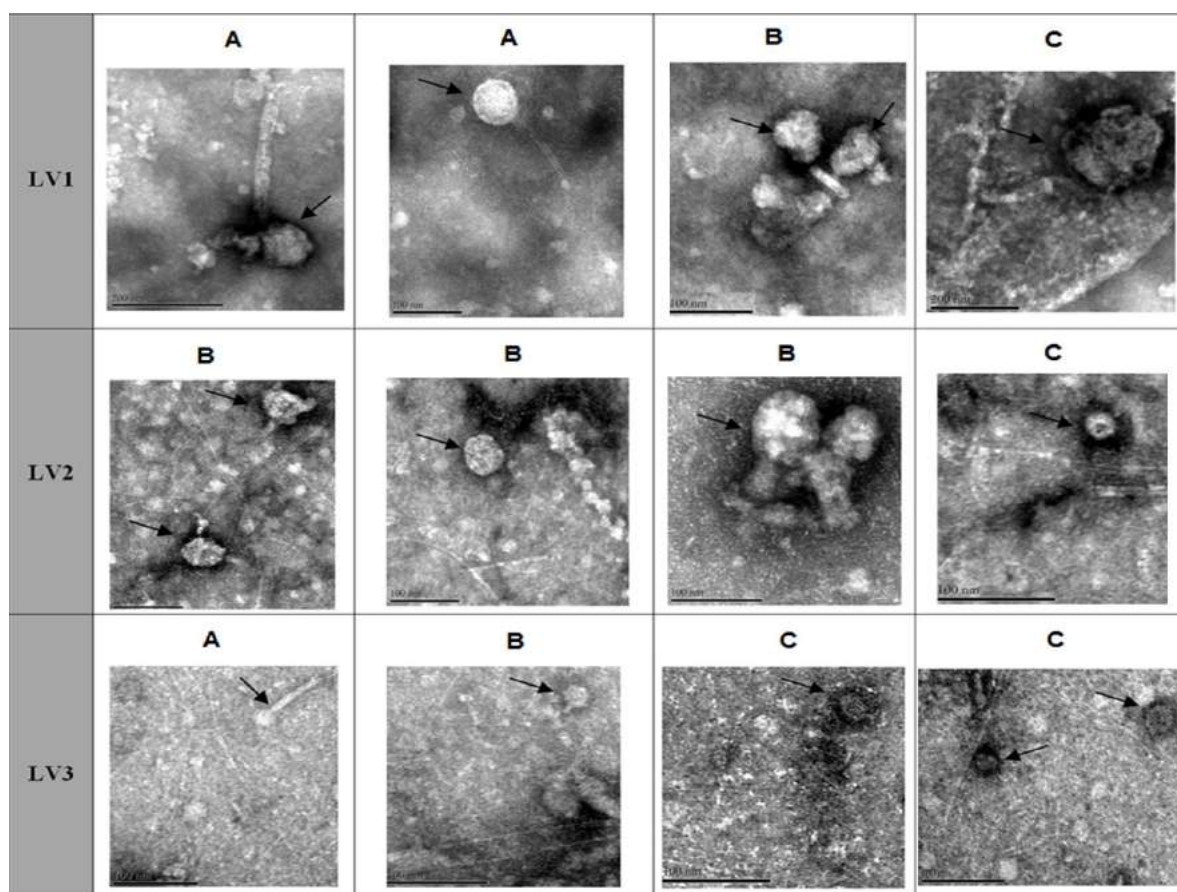


**Figura 21.** Avaliação pontual da abundância bacteriana comparada com a abundância viral nos pontos LV1, LV2 e LV3.

#### 4.6 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os resultados encontrados permitiram avaliar e sugerir a classificação em grupos de famílias de acordo com análise morfo-estrutural das partículas virais detectadas em cada ponto amostral. Dessa forma, foram caracterizados diferentes grupos virais de acordo com suas especificações através de comparações com a literatura.

A figura 22 abaixo ilustra as partículas virais detectadas contendo morfologias semelhantes a encontradas em integrantes da Ordem Caudovirales, mais especificamente das famílias *Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*. Vale resaltar que as amostras LV1 e LV3 apresentaram VLPs pertencentes às 3 famílias citadas anteriormente.



**Figura 22.** Micrografias da análise realizada com microscopia eletrônica de transmissão - 80kV. Amostras LV1, LV2 e LV3, coletadas na Lagoa Vermelha/RJ - Verão de 2014. A) Siphovírus. B) Myovírus. C) Podovírus. Barra de escala de 100nm.

## 5. DISCUSSÃO

A avaliação da qualidade da água, na Lagoa Vermelha, foi realizada com base nos limites impostos pela Resolução do CONAMA N°. 357, de 17 de março de 2005, onde algumas variáveis físico-químicas e biogeoquímicas mensuradas nos três pontos de coleta foram comparadas com padrões já estabelecidos para corpos hídricos salinos de classe 1 (Anexo 8.2), ressaltando a importância da preservação da vida aquática e padrões para lançamento de efluentes.

A "Região dos Lagos" é caracterizada por possuir um micro-clima de tipo semiárido quente a tropical (SILVA E SILVA *et al.*, 2004), o período de dezembro a janeiro é classificado como o de maior precipitação pluviométrica e temperatura com média de 25°C. Neste período de verão, podem ser constatados - em corpos hídricos - uma singela formação de camadas ao longo da coluna d'água com pequena variação térmica, portanto, os resultados referentes a temperatura média amena (23,23°C) encontrada no hipolímnio da Lagoa Vermelha (camada mais profunda da lagoa, fria e mais escura), condiz com a variação aceitável para as atividades biológicas rente ao substrato em regiões lacustres (CHERNICHARO, 2010).

O pH neutro (7,0) encontrado, pode ser inserido na faixa ótima de pH (pH 6,7 a 8,0) para locais eutrofizados, salinos e com despejo de esgotos predominantemente domésticos (VON SPERLING, 2005). A salinidade encontrada excedeu os limites do salinômetro utilizado, sendo maior que 70s, valor este característico de ambiente hipersalino (SILVA & SILVA *et al.*, 2004), sendo essa elevada salinidade altamente dependente do balanço hídrico na Lagoa relacionado com a precipitação, evaporação e entrada de água subterrânea de origem marinha e continental (SILVA E SILVA, 2005). Através da mensuração de Sólido Total Dissolvido (STD) encontramos o valor de 57,32 ppt, que indica um dado relativamente baixo para uma lagoa eutrofizada (PETRÚCIO, 1998), no entanto, a precipitação



pluviométrica no dia anterior ao dia da coleta, promoveu a diluição da água e consequentemente acarretou na redução das concentrações de STD (PEREIRA & MENDONÇA, 2006).

Os processos de circulação neste corpo lacustre são dominados pela ação dos ventos, os quais associados à baixa espessura da lâmina d'água e ao grande acúmulo de matéria orgânica, matérias sólidas em suspensão, microrganismos e algas favorecem a elevada turbidez encontrada (13,8 UNT), somado a isso estes sistemas podem variar seus parâmetros físico-químicos em função da ação de ventos, precipitação e poluição antrópica. O fato já mencionado, sobre a chuva do dia anterior a coleta, também colabora para o resultado encontrado de turbidez, onde ocorre um carreamento de sedimento das margens da Lagoa (PEREIRA & MENDONÇA, 2006).

De acordo com SANTOS & SANT'ANNA (2010), a condutividade elétrica média (112,3mS/cm) e o potencial de oxi-redução médio (87,63 mV) encontrados foram elevados e condizem com o esperado para regiões hipersalinas (> 2 mS/cm), já a concentração média de oxigênio dissolvido (3,9mg/L) foi baixa, podendo esse fato ser justificado pela grande concentração de matéria orgânica na lagoa, onde os organismos tenderiam a consumir o oxigênio dissolvido tornando o ambiente mais redutor, principalmente na interface entre a água e sedimento onde as amostras foram coletadas (PEREIRA & MENDONÇA, 2006). Além disso, as baixas concentrações de OD (abaixo de 6 mg/L) e elevadas concentrações de nutrientes (PT, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> e NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) encontrados nos 3 pontos de coleta, de acordo com o CONAMA (BRASIL, 2005), indicam que a Lagoa Vermelha se encontra eutrofizada, ocorrendo um enriquecimento da água com compostos derivados de fósforo e nitrogênio - gerando uma poluição orgânica - e causando efeitos tóxicos crônicos aos organismos, desequilíbrios na riqueza, distribuição e mortandade das espécies.

Os resultados relacionados aos pigmentos fotossintetizantes (Chl-a e Feo-a) demonstram uma grande variação dos valores encontrados, indicando uma relação direta com a profundidade coletada, turbidez e teores de oxigênio dissolvido. Regiões eutrofizadas possuem elevada turbidez, o que consequentemente desfavorece a fotossíntese, onde foram encontrados menores concentrações de clorofila-a em regiões mais profundas da coluna d'água. Porém, isso não foi o observado em nossos 3 pontos de coleta, onde apesar da elevada turbidez e baixa concentração de OD detectou-se elevados teores de Chl-a em alguns pontos. Portanto, nos pontos de coleta LV1 (30,44µM) e LV3 (50,20µM) foi identificada maior produtividade primária (crescimento fitoplanctônico) e taxa fotossintética quando se comparada ao ponto LV2 (5,85µM). Esses resultados podem ser justificados pela maior

intensidade luminosa nos pontos mais rasos (LV1 e LV2) e a grande eutrofização local, que permite o crescimento de organismos autotróficos, algas por exemplo, resistentes a eutrofização e capazes de captar energia luminosa mesmo com elevada turbidez local.

Concomitantemente, através da razão entre Feo-a (feopigmento desmetalado da clorofila-a) e Chl-a foi possível observar grande degradação da Chl-a no ponto LV2 e LV1, devido principalmente à proliferação de organismos heterotróficos e elevada intensidade luminosa ocasionando foto-degradação na Chl-a, respectivamente. Já o ponto LV3 obteve maiores taxas de fotossintética (50,20  $\mu\text{M}$ ) e menor degradação da Chl-a, sugerindo que o ponto LV3 está em ótimas condições fisiológicas e de produtividade primária mesmo em um ecossistema ser eutrofizado (BROTAS *et al.*, 1995).

Com o aumento da especulação imobiliária na Região dos Lagos, desde a construção da Ponte Costa e Silva (Ponte Rio-Niterói), o despejo de esgoto doméstico em sistemas lacustres da região passaram a ser relatados e a falência ambiental começou a ser decretada em diversos corpos hídricos devido a hiper-eutrofização (MOREIRA, 2003). Desse modo, diversas pesquisas na região foram desencadeadas, buscando averiguar a qualidade ambiental, preservação dos ecossistemas, bem estar da população, e conseqüentemente, estimular o turismo ecologicamente consciente. Por isso, trabalhos como o de HOHN *et al.* (1986) colaboraram para uma maior compreensão do cenário físico-químico da água e composição sedimentar da Lagoa Vermelha a 30 anos atrás.

A partir dos resultados de parâmetros físico-químicos na coluna d'água da Lagoa Vermelha, HOHN *et al.* (1986), demonstraram que o este ecossistema era muito diferente do atual, onde a temperatura média (30,15°C), pH alcalino (8,92) e oxigênio dissolvido (> 6 mg/L) eram maiores que os mesmos parâmetros mensurados neste trabalho. Portanto, através de uma comparação entre os resultados atuais é evidente que a Lagoa vem sofrendo um processo de degradação ambiental, principalmente por ação antrópica com despejo de esgoto doméstico, oriundo de casas (nos extremos leste e oeste), extração de sal aos arredores, balneabilidade e ligação com a eutrofizada Lagoa de Araruama. Todos esses fatores passaram a gerar, em longo prazo, elevação na concentração de fósforo, acarretando em alterações dos teores de clorofila-a e turbidez, determinando assim, um processo de eutrofização (BURGER *et al.*, 2008).

O resultado obtido no levantamento batimétrico, identificou que em média a lagoa apresentou 1,0 m de profundidade, onde apenas um pequeno núcleo central possuía profundidade de 1,4 m, indicando a ocorrência de um processo de assoreamento, pois HOHN *et al.* (1986) descreveram que ela possuía uma coluna d'água de até 1,70 m.

Essa grande eutrofização na Lagoa Vermelha pode ser causada até mesmo por um eficiente processo de remineralização, uma vez que foi apurado elevado número de células bacterianas nos três pontos de coleta, com variação de  $2,20 \times 10^9$  a  $5,73 \times 10^9$  células/mL. Não há literatura quantificando o número de células bacterianas na coluna d'água e sedimento da Lagoa Vermelha; assim a comparação foi realizada com resultados de amostras da coluna d'água do Sistema Lagunar de Maricá (GUERRA *et al.*, 2011), com média  $10^6$  células/mL. A elevada abundância bacteriana, possivelmente está correlacionada com características específicas de lagoas hipersalinas onde são encontradas altas concentrações de matéria orgânica devido ao reabastecimento de nutrientes que substitui a perda por evaporação (HOHN & TOBSCHALL, 1986).

Portanto em ambientes com altas concentrações de matéria orgânica, como é o caso da Lagoa Vermelha, ocorre um favorecimento do crescimento de microrganismos como bactérias aeróbicas, anaeróbicas e vírus que realizam a ciclagem de nutrientes no ambiente transformando-os de orgânicos para inorgânicos. Vale ressaltar que, através da observação amostral foi possível identificar também a presença de protistas, colônias bacterianas e partículas semelhantes a vírus (VLPs), assim como biofilmes bacterianos formados principalmente devido a elevada abundância de bactérias encontrada, onde graças a agregações ou interações celulares em condições em aerobiose ou anaerobiose são gerados produtos extracelulares viscosos e compactados (exopolissacarídeo, proteínas, ácidos nucleicos, etc.) que aderem-se a superfícies bióticas ou abióticas (DAVEY & O'TOOLE, 2000).

Os resultados referentes à abundância viral (VLPs), demonstram que a grande densidade viral nos três pontos de coleta, variando de  $2,28 \times 10^9$  a  $2,77 \times 10^9$  partículas/mL, é comumente relatada em ambientes hipersalinos no mundo, como por exemplo, a Mono Lake (Califórnia - EUA), salinas no Mediterrâneo, salinas no Sul da Coreia dentre outros (GUIXA-BOIXAREU, 1996; SCHAPIRA, 2009; BETTARREL *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

Geralmente o número de VLPs está diretamente relacionado com o número de células de hospedeiros disponíveis, essa correlação aumenta tratando-se de ambientes hipersalinos como a Lagoa Vermelha, devido principalmente a grande disponibilidade de matéria orgânica e de abundância bacteriana como já foi mencionado anteriormente (SANTOS *et al.*, 2012). Porém, através de uma análise geral da média obtida entre os três pontos de coleta, podemos notar que a abundância bacteriana média ( $3,63 \times 10^9$  céls./mL) excedeu aproximadamente 1 vez a abundância viral média ( $2,56 \times 10^9$  partículas/mL), resultado normalmente não relatado em ecossistemas hipersalinos preservados (BETTARREL *et al.*, 2010). Todavia, diversos

trabalhos sugerem que em condições desfavoráveis a replicação lítica, como: modificações bruscas das condições físico-químicas e redução abrupta de hospedeiros, as partículas virais deixam de realizar a infecção lítica e optam pela lisogênica, inserindo assim seu material genético na célula hospedeira, que por sua vez, se reproduz carregando em seu genoma os genes virais. Essas condições estressantes geradas, essencialmente, pelas grandes descargas de poluentes domésticos, estimulam o crescimento bacteriano e na ausência de predadores bacterianos (baixa bacterivoria) esses organismos se proliferam abundantemente, fato este observado em nosso trabalho e fundamentando a elevada abundância bacteriana ( $10^9$  céls./mL), na mesma ordem de grandeza da abundância viral ( $10^9$  partículas/mL) (JIANG *et al.*, 2004; SANTOS *et al.*, 2012).

Com a microscopia eletrônica de transmissão, obtivemos sucesso na detecção de partículas virais da ordem Caudovirales, onde vírus com morfologia, tamanho e estrutura semelhantes aos da família *Podoviridae*, *Myoviridae* e *Siphoviridae* estavam presentes na água, rente ao substrado, da Lagoa Vermelha independente das condições de eutrofização e degradação ambiental identificadas. PACTON *et al.* (2014), constatou a através da técnica de metagenômica, a presença de 585 cepas virais ( $10^{11}$  partículas/g) nas esteiras microbianas da Lagoa Vermelha (coleta realizada em 2011), onde 64% dessas cepas pertenciam aos Caudovirales com tamanhos de 50-100 nm, sendo a família *Siphoviridae* identificada em maior abundância (50%), *Myoviridae* com 35% e *Podoviridae* com menor abundância (15%). Elucidando, portanto, a interação destes agentes virais como organomineralizadores presentes em esteiras microbianas e ressaltando grande importância dos vírus na história evolutiva e geológica da Terra.

A grande abundância dos cianófagos Caudovirales é comumente relatada em diversos ecossistemas no mundo, não sendo diferente neste trabalho. Esses microrganismos compõem cerca de 95% dos bacteriófagos já conhecidos e essa superabundância é devido, as cianobactérias - "fósseis vivos" presentes em ambientes aquáticos, capazes de produzir toxinas e se desenvolver em ambientes com elevados níveis de nutrientes - que ao longo da história evolutiva adquiriram grande adaptação morfológica, bioquímica e fisiológica, tornando-se extremamente abundantes, sendo portanto, um hospedeiro favorável a infecções virais (BITTENCOURT-OLIVEIRA & MOLICA, 2003).

Sendo assim, é de extrema importância o estudo da microbiota e biogeoquímico em sistemas hipersalinos (GUIXA-BOIXAREU, 1996; SANTOS, 2012).

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Através das análises físico-químicas, biogeoquímicas e microbiológicas, foi possível constatar que ao longo de 30 anos a Lagoa Vermelha têm sofrido intensa deterioração na qualidade ambiental, com elevada eutrofização. Onde apesar da diferença de profundidade e de latitude, os três pontos analisados em questão demonstram-se praticamente homogêneos devido a grande mistura vertical da coluna d'água. As diferenças de produtividade primária e degradação da Chl-a, encontradas nos 3 pontos de coleta, indicam que apesar desta eutrofização, locais distintos da Lagoa podem possuir diferentes padrões de produtividade primária e quimiossíntese de acordo com a incidência luminosa, turbidez, teor de oxigênio dissolvido e profundidade. Portanto, a Lagoa Vermelha pode ser classificada como um ecossistema rico em matéria orgânica e inorgânica, neutro, hipersalino, quase hipóxico, com elevada condutividade, potencial de oxi-redução, turva e com grande produtividade primária pontual, permitindo a sobrevivência de restritos organismos como, por exemplo, arqueias, procariontes redutores, cianobactérias, VLPs, protozoários e algas.

Com relação a amostragem microbiológica nos três pontos da Lagoa Vermelha, foi possível observar elevada e semelhante abundância bacteriana e viral na ordem de grandeza de  $10^9$  cels./mL, sugerindo que independentemente da eutrofização da lagoa, organismos heterotróficos - como as bactérias - são favorecidos, gerando assim um aumento populacional de hospedeiros celulares para as partículas virais infectarem. Estimulando dessa maneira, a lisogenia viral, garantindo a conservação do genoma viral no hospedeiro e sua estabilidade quantitativa mesmo em condições hostis.

Assim, foi possível detectar a presença de 3 famílias virais (*Siphoviridae*, *Myoviridae* e *Podoviridae*) pertencentes a ordem mais abundante e cosmopolita de cianófagos já descrita no mundo.

Apesar da detecção viral e análise das condições biogeoquímicas ambiental, é necessário o refinamento o aperfeiçoamento de técnicas mais sofisticadas, como por exemplo o sequenciamento, para identificação e elucidação adequada dos vírus presentes na Lagoa.

Portanto, este trabalho serve como base para futuras análises na virologia aquática ambiental da Lagoa Vermelha, que por possuir características únicas - como a grande hipersalinidade e biodiversidade restrita - se destaca entre outros ecossistemas no Rio de Janeiro. Assim sendo, Lagoa Vermelha é um dos poucos ecossistemas no mundo com a presença de estromatólitos, construções organosedimentares que evidenciam formas microscópicas de vida na Terra datadas no período Pré-Cambriano, havendo deste modo, um grande apelo pela preservação e monitoramento ambiental neste ecossistema tão singular, sendo de suma importância futuras análises do papel dos vírus halófilos na dinâmica desse ecossistema lacustre hipersalino.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AALTO AP, BITTO D, RAVANTTI JJ, BAMFORD DH, HUIKONEN JT, OKSANEN HM. Snapshot of virus evolution in hypersaline environments from the characterization of a membrane- containing Salisaeta icosahedral phage 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2012, 109:7079-7084.
- ABEDON S, 2008. Bacteriophage ecology. Population growth, evolution and impact of bacterial viruses. Cambridge University press, Cambridge, 508 p.
- ACCETTA, D. Campanha de Medições Hidráulico-Sedimentológicas na Lagoa de Araruama; Campanha de Verão. Rio de Janeiro, PORTOBRÁS. 126 p. 1987.
- ACKERMANN H-W. 5500 Phages examined in the electron microscope. *Arch. Virol.* 2007;152:227–243.
- ANTUNES A, ALAM I, SIMÕES MF, DANIELS C, FERREIRA AJ, SIAM R, EL-DORRY H, BAJIC VB. 2015. First Insights into the Viral Communities of the Deep-sea Anoxic Brines of the Red Sea. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* doi: 10.1016/j.gpb.2015.06.004.
- ATANASOVA NS, ROINE E, OREN A, BAMFORD DH, OKSANEN HM. Global network of specific virus–host interactions in hypersaline environments. *Environ Microbiol* 2012, 14:426-440.
- AZAM F., FENCHEL, T, FIELD FD, GRAY, JS, MEYER-REIL, LA, THINGSTAD, F. The Ecological Role of Water-Column Microbes in Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 10: 257-263. 1983.
- BARBOSA, J.E.F.P. Estudo da quantificação e identificação de vírus marinhos em dois diferentes sistemas costeiros do estado do Rio de Janeiro. 2014. 228 p. Tese (Doutorado em Biologia Marinha) - Universidade Federal Fluminense.

- BARROSO, L.V. & BERNARDES, M.C. 1995. Um patrimônio ameaçado: poluição, invasão e turismo sem controle ameaçam as lagoas fluminenses. *Ciência Hoje*, 19(110):70-74.
- BEIJERINCK, M.W. Over een Contagium vivum fluidum als oorzaak van de Vlekziekte der tabaksbladen. *Versl. Gew. Verg. Wis- en Natuurk. Afd.*, , Kon. Akad. Wetensch. Amsterdam VII, 229-235. 1898.
- BERGH O, BORSHEIM KY, BRATBAK G & HELDAL M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467–468. 1989.
- BETTAREL Y, DESNUES A, ROCHELLE-NEWALL E. 2010. Lytic-failure in cross inoculation assays between phages and prokaryotes from three aquatic sites of contrasting salinity. *FEMS Microbiol. Let.* 311:113–118.
- BIDEGAIN, P., BIZERRIL, C. SOFFIATI, A. (2002). Lagoas do Norte Fluminense: perfil ambiental. Rio de Janeiro, Fundação Superintendência Estadual de Rios e Lagoas (SERLA), 148 p. (Boletim 14).
- BITTENCOURT-OLIVEIRA, M.C; MOLICA, R. 2003. Cianobactéria invasora. *Revista de Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 30: 82-90.
- BODAKER, I., SHARON I., SUZUKI M T., FEINGERSCH R., SHMOISH M.; ANDREISHCHEVA E.; SOGIN M.L.; ROSENBERG M.; MAGUIRE M.E.; BELKIN S.; OREN A.; BÉJÁ O. (2010) Comparative community genomics in the Dead Sea. 2010. *The ISME Journal*. 4, 399–407.
- BODAKER, I., I. SHARON, M. T. SUZUKI, R. REINGERSCH, M. SHMOISH, E. ANDREISHCHEVA, M. L. SOGIN, M. ROSENBERG, S. BELKIN, A. OREN, AND O. BÉJÀ. The dying Dead Sea: comparative community genomics in an increasingly extreme environment. *ISME J*. 4:399-407. 2010.
- BRASIL. Resolução CONAMA n.º 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. *Diário Oficial da República federativa do Brasil*, Brasília, Seção 1, p. 58- 63, 2005.
- BRATBAK G, EGGE JK & HELDAL M. 1993. Viral mortality of the marine alga *Emiliania huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms. *Marine Ecology Progress Series*, 93:39-48.
- BRATBAK, G., THINGSTAD, F. & HELDAL, M. Viruses and the microbial loop. *Microb. Ecol.* 28: 209–21. 1994.
- BREITBART M. Marine viruses: truth or dare. *Ann Rev Mar Sci.* 4: 425–448. 2012.



- BROTAS, V., T. CABRITA, A. PORTUGAL, J. SERODIO & F. CATARINO. 1995. Spatio-temporal distribution of the microphytobenthic biomass in intertidal flats of Tagus estuary (Portugal). *Hydrobiologia* 300–301: 93–104.
- BRUSSAARD CPD, WILHELM SW, THINGSTAD F, WEINBAUER MG, BRATBAK G, HELDAL M, KIMMANCE SA, MIDDELBOE M, NAGASAKI K, PAUL JH, DECLAN C SCHROEDER DC, SUTTLE CA, WOMMACK KE. Global-scale processes with a nanoscale drive: the role of marine viruse. *Microbial Ecology* 2, 575-578. 2008.
- BURGER, D. F., HAMILTON, D.P., PILDITCH, C.A. Modelling the relative importance of 30 internal and external nutrient loads on water column nutrient concentrations and phytoplankton biomass in a shallow polymitic lake. *Ecol. Model.* 211,411-423,Hamilton, New Zealand, 2008.
- CARLUCCI, A. F., CRAVEN, D. B., HENRICHS, S. M. (1985). Surface film microheterotrophs: amino-acid metabolism and solar radiation effects on their activities. *Mar. Biol.* 85: 13-22
- CETESB. Companhia de Tecnologia de Saneamento Básico. Significado ambiental e sanitário das variáveis de qualidade das águas e dos sedimentos e metodologias analíticas de amostragem. São Paulo. 2008. 41p.
- CHAIVISUTHANGKURA P., LONGYAN S., SITHIGORNGUL P. Immunological-based assays for specific detection of shrimp viruses. *World J Virol.*3 (1): 1–10. 2014.
- CHEN, Z., HSU, F.C, BATTIGELLI, D. & CHANG, H.C. Capture and release of viruses using amino-funcionalized silica particles. *Analytica Chemica Acta*, 569: 76-82. 2006.
- CHERNICHARO, C.A. “Pós-Tratamento de Efluentes de Reatores Anaeróbios”. Programa de Pesquisa em Saneamento Básico – PROSAB. FINEP/CNPq/Caixa Econômica Federal. Rio de Janeiro, 2.000.
- CHOI, J.; KOTAY, S.M.; GOEL, R. Bacteriophage-based biocontrol of biological sludge bulking in wastewater. *Bioengineered Bugs*, v. 2, n.4, p. 214-217, 2011.
- CLASEN JL, SUTTLE, CA. Identification of freshwater *Phycodnaviridae* and their potential phytoplankton hosts, using DNA pol sequence fragments and a genetic-distance analysis. *Appl. Environ. Microbiol*, 75: 991-997. 2009.
- CLESCERI, S.L., GREENBERG, A.E. & EATON, A.D.. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA). 21 ed. Washington: American Public Health Association. 2005.

- COSTA, M.N. Estudo do mecanismo de ação de derivados aminoálcoois e de derivados do sistema tienopiridina na replicação in vitro do vírus herpes simples tipo 1. 2007. . Niterói: [s. n.]. 88f. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia) Universidade Federal Fluminense. CDD 616.52.
- CULVER, J.N. TOBACCO MOSAIC VIRUS ASSEMBLY AND DISASSEMBLY: Determinants in Pathogenicity and Resistance. 2002. Annual Review of Phytopathology. Vol. 40: 287-308 (Volume publication date September 2002). DOI: 10.1146/annurev.phyto.40.120301.102400.
- DALLORA, A.M.B. Estudo da ocorrência de casos confirmados de raiva bovina no município de Guaxupé, Minas Gerais – Ribeirão Preto, 2007. 91f. Dissertação (Mestrado em Saúde na Comunidade) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.
- DAMAZIO, C. M. & SILVA E SILVA, L. H. Cianobactérias em esteiras microbianas coliformes da lagoa Pitanguinha, Rio de Janeiro, Brasil. *Revista Brasileira de Paleontologia*, 9 (1) 15 - 26. 2006.
- DANG VT, Benkendorff, K., Speck, P. In vitro antiviral activity against herpes simplex virus in the abalone *Haliotis laevis*. *Journal of General Virology* (2011), 92, 627–637. 2011.
- DANOVARO R, DELL'ANNO A, CORINALDESI C, MAGAGNINI M, NOBLE R, TAMBURINI C. Major viral impact on the functioning of benthic deep-sea ecosystems. *Nature* 454: 1084–1087. 2008.
- DAVEY, M. E., & O'TOOLE, G. A. (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(4), 847–867.
- DESNUES C, RODRIGUEZ-BRITO B, RAYWAK S, KELLEY S, TRAN T, HAYNES M, LIU H, FURLAN M. Biodiversity and biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature*, 452: 340-345. 2008.
- DESNUES, C. & Raoult, D. Inside the Lifestyle of the Virophage. 2010. *Intervirology*. Volume 53. p:293–303 DOI: 10.1159/000312914.
- DUTOVA N. V. AND DRUCKER. V. V. Viral Community of Biofilms Forming on Different Substrates under Natural Conditions of Lake Baikal. 2013. *ISSN 0012\_4966, Doklady Biological Sciences, 2013, Vol. 451, pp. 238–240. © Pleiades Publishing, Ltd., 2013. Original Russian Text © N.V. Dutova, V.V. Drucker, 2013, published in Doklady Akademii Nauk, 2013, Vol. 451, No. 4, pp. 468–470. Presented by Academician M.A. Grachev August 2, 2012. DOI: 10.1134/S0012496613030113.*

- ESTEVEES, FA. Fundamentos de limnologia. Rio de Janeiro: Interciência. 575 p. 1988.
- FARIAS, M.S.S. Monitoramento da qualidade da água na bacia hidrográfica do Rio Cabelo. Campina Grande, 2006. Tese (Doutorado em Engenharia Agrícola) - UFCG - Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, 2006.
- FEINER, R.; ARGOV, T.; RABINOVICH, L.; SIGAL, N.; BOROVOK, I.; HERSKOVITS, A.A.; A new perspective on lysogeny: prophages as active regulatory switches of bacteria. 2015. NATURE REVIEWS | MICROBIOLOGY. VOLUME 13 | OCTOBER 2015 | 641-650. doi:10.1038/nrmicro3527.
- FORTERRE P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. Virus research, 117 (1), 5-16. 2006.
- FRADA, M.J. AND VARDI, A. 2015. Algal viruses hitchhiking on zooplankton across phytoplankton blooms. Department of Plant and Environmental Sciences; The Weizmann Institute of Science; Rehovot, Israel. Communicative & Integrative Biology 8:3, e1029210; Published with license by Taylor & Francis Group, LLC.
- FUHRMAN JA, SUTTLE CA. Viruses in Marine Planktonic Systems. Oceanography, 6: 51-63. 1993.
- GAIA, M; PAGNIER I, CAMPOCASSO A, FOURNOUS G, RAOULT D. (2013) Broad Spectrum of Mimiviridae Virophage Allows Its Isolation Using a Mimivirus Reporter. PLoS ONE 8(4): e61912. doi:10.1371/journal.pone.0061912
- GRASSHOFF, K., EHRHARDT, M. and KREMLING, K. Methods of seawater analysis, Verlag Chemie, Weinheim, 2nd ed, pp. 21-30. 1983.
- GUERRA, L. V.; SAVERGNINI, F.; SILVA, F. S.; BERNARDES, M. C.; CRAPEZ, M. A. C. Biochemical and microbiological tools for the evaluation of environmental quality of a coastal lagoon system in southern Brazil. Braz. J. Biol., v. 71, n. 2, p. 461-468, 2011.
- GUIMARÃES M.S., GITIRANA M.H, WANDERLEY V.A., MONTEIRO C.N., LOBO-HAJDU G. Evidence of regression of fibropapillomas in juvenile green turtles *Chelonia mydas* caught in Niterói, southeast Brazil. Dis Aquat Organ. 102(3):243-7. 2013
- GUIXA-BOIXAREU N, CALDERÓN-PAZ JI, HELDAL M, BRATBAK G, PEDRÓS-ALIÓ. C. 1996. Viral lysis and bacterivory as prokaryotic loss factors along a salinity gradient. Aquat. Microb. Ecol. 11:215–227. 24.
- HAMZA, I. A., JURZIK, L., STANG, A., SURE, K., UBERLA, K. & WILHELM, M. Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a

- virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res* 43, 2657–2668. (2009).
- HARGREAVES, K.R., JOHN A.N. & CLOKIE. M.R.J. 2013. Recovery of viable cyanophages from the sediments of a eutrophic lake at decadal timescales. *FEMS Microbiol Ecol* 83, pp 450–456. DOI: 10.1111/1574-6941.12005.
- HAWKES, Peter W. *The Beginning of Electron Microscopy. Advances in Electronics and Electron Physics. Supl. 16.* Academic Press, 2013.
- HEGENBERG, L. *Doença: um estudo filosófico* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1998. 137 p. ISBN: 85-85676-44-2. Available from SciELO Books.
- HOHN, A & TOBSCHALL, H.J. Biogeochemistry of a hypersaline lagoon east of Rio de Janeiro, Brazil. 1986. Original Research Article; Pages 175-185;
- HULO C, CASTRO E, MASSON P, BOUGUELERET L, BAIROCH A, XENARIOS I & Le MERCIER P. ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity. *Nucleic Acids Res* 39: D576–D582. 2011.
- HURST, C.J. *Viral Ecology.* 2000. ACADEMIC PRESS. CANADA. ISBN: 9780080543567.
- INMET, 2014. *Climatologia da Faixa Normal (Tercil Médio) - Referência para o Prognóstico Climático em Iguaba Grande, RJ-* [www.inmet.gov.br/webcdp/climatologia/faixa\\_normal/mostra\\_info.php](http://www.inmet.gov.br/webcdp/climatologia/faixa_normal/mostra_info.php). acessado em: 11/03/14.
- JACKSON E.F., JACKSON C.R. Special Issue: Viruses in Freshwater Ecosystems. Volume 53, Issue 6, pages 1214–1227. 2008.
- JACQUET S, MIKI T, NOBLE R, PEDUZZI P & WILHELM S, 2010. Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 year and prospects for the future in the field microbial oceanography and limnology. *Advances in Oceanography and Limnology*, 1:71-101.
- JEFFREY, S.W. AND G.F. HUMPHREY, "New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophylls a, b, c1 + c2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton," *Biochem. Physiol. Pflanzen. Bd, 167, S. pp. 191-4.* 1975.
- JIANG S.; STEWARD G.; JELLISON R.; CHU W.; CHOI S. Abundance, Distribution, and Diversity of Viruses in Alkaline, Hypersaline Mono Lake, California. *Microbial Ecology.* Volume 47, Issue 1 , pp 9-17.2004.
- JIAO, N., HERNDL, G.J., HANSELL, D. RONALD BENNER, A;KATTNER, G;WEINBAUER, M. G.; AZAM, F, Microbial production of recalcitrant dissolved

- organic matter: long-term carbon storage in the global ocean. Nat Rev Microbiol. 2010 Aug;8(8):593-9. 2010.
- KÅHRSTRÖM C.T. Pandora's box goes viral. *Nature Reviews Microbiology* 11, 598. 2013.
- KATAYAMA, H., SHIMASAKI, A. & OHGAKI, S. Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68: 1033-1039. 2002.
- KEPNER, R.L., PRATT, J.R. Use of fluorochromes for direct enumeration of total bacteria in environmental samples: past and present. *Microbiol. Rev.* 58, 603 – 615. 1994.
- KIM WS., CHOI SY, KIM DH, OH MJ. A survey of fish viruses isolated from wild marine fishes from the coastal waters of southern Korea. *Journal of Veterinary*
- KNOPPERS, B. Aquatic primary production. In: KJERFVE, B. (ed.) *Coastal lagoon processes*. Amsterdam: Elsevier Oceanography Series, p. 243-286. 1994.
- KOSKELLA B., MEADEN S. Understanding Bacteriophage Specificity in Natural Microbial Communities. *Viruses*, 5, 806-823. 2013.
- KUKKARO P, BAMFORD DH. Virus–host interactions in environments with a wide range of ionic strengths. *Environ Microbiol Rep* 2009, 1:71-77.
- KUTTER EM, SKUTT-KAKARIA K, BLASDEL B, EL-SHIBINY A, CASTANO A, BRYAN D.. Characterization of a ViI-like phage specific to *Escherichia coli*O157:H7. *Viol J* 8: 430. 2011.
- LEE, J., WORDEN J., NOONE D., BOWMAN K., ELDERING A., LEGRANDE A., LI, J.-L.F., SCHMIDT G., SODEMANN, S. Relating tropical ocean clouds to moist processes using water vapor isotope measurements. *Atmos. Chem. Phys.*, 11, 741-752. 2011.
- LORENZEN, C.J., "Determination of Chlorophyll and Pheo-Pigments: Spectrophotometric Equations," *Limnol. Oceanogr.*, 12. pp. 343-6. 1967.
- LUEF B., NEU T.R., PEDDUZI P. Imaging and quantifying virus fluorescence signals on aquatic aggregates: a new method and its implication for aquatic microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* 68 (3):372-380. 2009.
- LWOFF, A. 1957. J. The Concept of Virus. *Gen. Microbiol.* 17:239–253.
- MANSUR, K. L; Elaboração do inventário geológico e do roteiro geoturístico para a implantação do geoparque costões e lagunas do estado do rio de janeiro. Protocolo do sigproj: 139395.604.125904.22012013. UFRJ. 2013.

- MIDDELBOE, M., JACQUET, S. and WEINBAUER, M. (2008), Viruses in freshwater ecosystems: an introduction to the exploration of viruses in new aquatic habitats. *Freshwater Biology*, 53: 1069–1075. doi:10.1111/j.1365-2427.2008.02014.
- MOREIRA, A.L.C. (2003). A eutrofização na Lagoa de Araruama e o impacto ambiental das estações de tratamento secundário. Tese (MSc). UFF. *Jornal Ambiente Brasil*. Disponível em: [http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos\\_agua\\_salgada/a\\_eutrofizacao\\_na\\_lagoa\\_de\\_araruama\\_e\\_o\\_impacto\\_ambiental\\_das\\_estacoes\\_de\\_tratamento\\_secundario.html](http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/artigos_agua_salgada/a_eutrofizacao_na_lagoa_de_araruama_e_o_impacto_ambiental_das_estacoes_de_tratamento_secundario.html). Acesso em 27 dez. 2013.
- MURPHY, F. A., D. H. L. BISHOP, S. A. GHABRIAL, A. W. JARVIS, G. P. MARTELLI, M. A. MAYO, AND M. D. SUMMERS. 1995. Virus taxonomy: Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag.
- OLIVEIRA, J. P. W.; DOS SANTOS, R. N.; PIBERNAT, C. C.; BOEIRA, J. M. Genotoxicidade e análises físico-químicas das águas do rio dos Sinos (RS) usando *Allium cepa* e *Eichhornia crassipes* como bioindicadores. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, v. 1, n. 1, p. 15-22, 2012. <http://dx.doi.org/10.5433/2316-5200.2012v1n1p15>.
- OREN, A. Diversity of halophilic microorganisms: environments, phylogeny, physiology, and applications. *J Ind Microbiol Biotechnol* 28, 56–63. 2002.
- ORTMANN A.C., LAWRENCE J.E. AND SUTTLE C.A. Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the *Cyanobacterium*, *Synechococcus* spp. *Microbial Ecology* 43:225-231. 2002.
- OTAWA, K.; LEE, H. SANG, 2006. Abundance, diversity, and dynamics of viruses on microorganisms phytoplankton growth. *AquatMicrob Ecol*. Vol. 66: 41–46, 2012
- PACTON, M; WACEY, D.; CORINALDESI, C.; TANGHERLINI, M.; KILBURN, M.R.; CORIN, G.E.; DANOVARO, R.; VACONCELOS, C. (2014). Viruses as new agents of organomineralization in the geological record. *Nat. Commun.* 5:4298.
- PATEL A, NOBLE RT, STEELE JA, SCHWALBACH MS, HEWSON I, FUHRMAN JA. Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I. *Nat Protoc.*;2(2):269-76. 2007.
- PATTEN NL, HARRISON P, MITCHELL A. Prevalence of virus-like particles within a staghorn scleractinian coral (*Acropora muricata*) from the Great Barrier Reef. 2008.

- PATTEN NL, SEYMOUR JR, MITCHELL JG. Flow cytometric analysis of virus-like particles and heterotrophic bacteria within coral-associated reef water. *J Mar Biol Assoc UK* 86:563-566. 2006.
- PEDRÓS-ALIÓ C, CALDERÓN-PAZ JI, MACLEAN MH, MEDINA G, MARRASÉ C, GASOL JM, GUIXA-BOIXEREU N. The microbial food web along salinity gradients. *FEMS Microbiol Ecol.* 1;32(2):143-155. 2000.
- PEDUZZI, P., AND B. LUEF. Viruses, bacteria and suspended particles in a backwater and main channel site of the Danube (Austria). *Aquat. Sci.* 70:186-194. 2008.
- PEREIRA, A.A. & MENDONÇA, A. S. F. Aspectos Qualitativos de Águas de Lagoas Costeiras e seus Fatores Influentes – Estudo de Caso: Lagoa MÃE-BÁ, Espírito Santo. 2006. RBRH – Revista Brasileira de Recursos Hídricos Volume 11 n.1 Jan/Mar 2006, 63-77.
- PETRUCIO, M.M. 1998. Caracterização das lagoas Imboassica, Cabiúnas, Comprida e Carapebus a partir da temperatura, salinidade, condutividade, alcalinidade, O<sub>2</sub> dissolvido, pH, transparência e material em suspensão. In: *F.A. Esteves (ed). Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Juturnaíba e do Município de Macaé (RJ), Editora da Universidade Federal do Rio de Janeiro, p 109- 112.*
- PRADEEPRAM, A.S & SIME-NGANDO, T, 2010. Resource drive trade-off between viral lifestyles in the plankton: evidence from freshwater microbial microcosms. *Environmental Microbiology*, 12:467-479.
- PRANGISHVILI, D., VESTERGAARD, G., HÄRING, M., ARAMAYO, R., BASTA, T., RACHEL, R. & GARRETT, R. A. J. Structural and genomic properties of the hyperthermophilic archaeal virus ATV with an extracellular stage of the reproductive cycle;. *Molec. Biol.* 359, 1203-1216, 2006.
- RAOULT, D & Forterre, P. 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nat Rev Microbiol*, 2008 Apr;6(4):315-9.
- ROBBINS FC, Daniel TM. A history of poliomyelitis. In Daniel TM, Robbins FC, eds. *Polio*, Rochester New York, University of Rochester Press, 1997:5- 22
- ROHWER F & THURBER RV. Viruses manipulate the marine environment. *Nature.* 459: 207-212. 2009.
- ROLAND, F. Produção fitoplancônica em diferentes classes de tamanho nas lagoas de Imboassica e Cabiúnas. In: ESTEVES, F. A. *Ecologia das lagoas costeiras do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e do município de Macaé (RJ)*. Rio de Janeiro: Interciência, 1998. p. 159-160.

- SANTANA-PEREIRA, P. Isolamento e identificação de vírus marinho no coral *Siderastrea stellata* em Arraial do Cabo e Búzios/RJ. Dissertação. Universidade Federal Fluminense. Programa de Pós-Graduação em Ciências e Biotecnologia. 110p. 2014.
- SANTELLI, R. C. L. 1988. Estudos de isótopos estáveis em sedimentos carbonáticos da Lagoa Vermelha – RJ. Programa de Pós-graduação em Química, Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Tese de Doutorado, 95 p.
- SANTINI S., JEUDY S. BARTOLI J. POIROT O. LESCOT M., ABERGEL C., BARBE V., WOMMACK K.E., NOORDELOOS A.A.M, BRUSSAARD C.P.D., CLAVERIEJ.M. Genome of *Phaeocystis globosa* virus PgV-16T highlights the common ancestry of the largest known DNA viruses infecting eukaryotes. PNAS, vol. 110 no. 26,10800–10805. 2013
- SANTOS F., YARZA P.A.D, VÍCTOR PARRO,V. MESEGUER, I.A.C, ROSSELLÓ-MÓRA, R.D AND ANTÓNA, J E. 2012. Culture-Independent Approaches for Studying Viruses from Hypersaline Environments. Applied and Environmental Microbiology p. 1635–1643
- SANTOS, K.R.S.; SANT'ANNA, C.L. Cianobactérias de diferentes tipos de lagoas ("salina", "salitrada" e "baía") representativas do Pantanal da Nhecolândia, MS, Brasil. Rev. bras. Bot., São Paulo , v. 33, n. 1, p. 61-83, Mar. 2010 .
- SAVENIJE, H. H. G.; PAGÈS, J. Hypersalinity: a dramatic change in the hydrology of Sahelian estuaries. Journal of Hydrology, v. 135, p. 157-174, 1992.
- SCHAPIRA M, BUSCOT-LETERME MJSC, POLLET T, CHAPPERON C, SEURONT L. 2009. Distribution of heterotrophic bacteria and virus-like particles along a salinity gradient in a hypersaline coastal lagoon. Aquat. Microb. Ecol.54:171–183.
- SCLIAR, M. História do conceito da saúde. 2007. PHYSIS: Rev. Saúde Coletiva, Rio de Janeiro, 17(1):29-41.
- SCOR-UNESCO. Determination of photosynthetic pigments in seawater. Monographs on Oceanographic Methodology, UNESCO, Paris, Vol. 1 pp 11-18. .1996.
- SEAMAN PF, DAY MJ: Isolation and characterization of a bacteriophage with an unusually large genome from the Great Salt Plains National Wildlife Refuge, Oklahoma, USA. FEMS Microbiol Ecol 2007, 60:1-13.
- SEKAR A. & KANDASAMY K. Bacterial viruses in marine environment and their ecological role and bioprospecting potential: a review. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci . 2(7): 151-163. 2013.



- SEKAR A. AND KANDASAMY K. Bacterial viruses in marine environment and their ecological role and bioprospecting potential: a review. (2013) *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2(7): 151-163.
- SHEN PS, DOMEK MJ, SANZ-GARCIA E, MAKAJU A, TAYLOR RM, HOGGAN R, CULUMBER MD, OBERG CJ, BREAKWELL DP, PRINCE JT. Sequence and structural characterization of great salt lake bacteriophage CW02, a member of the T7-like supergroup. *J Virol* 2012, 86:7907-7917.
- SIERRA E., ZUCCA, D., ARBELO M., GARCÍA-ÁLVAREZ N., ANDRADA M., DÉNIZ S., FERNÁNDEZ A. Fatal Systemic Morbillivirus in Bottlenose Dolphin, Canary Islands, Spain. *Emerg Infect Dis.* 20(2): 269–271. 2014.
- SILLANKORVA, S. M. Utilização de Bacteriófagos no Controlo de Células Suspensas e Biofilmes de *Pseudomonas fluorescens*. 2004. Universidade do Minho. Escola de Engenharia. Dissertação Mestrado em Tecnologia do Ambiente. Departamento de Engenharia Biológica.
- SILVA E SILVA, L. H. & CARVALHAL, S.B.V. Biolaminóides Calcários Holocênicos: o Caso da Lagoa Vermelha, Brasil. 2005. Anuário do Instituto de Geociências - UFRJ ISSN 0101-9759 - Vol. 28 - 2 /2005 p. 59-70.
- SILVA E SILVA, L. H.; SENRA, T.C.L.M.; FARUOLO T.C.L.M; CARVALHAL, S. B. V.; ALVES, S. A. P. M. N.; DAMAZIO, C. M.; SHIMIZU, V. T. A.; SANTOS, R.C & IESPA, A.A.C. 2004. Composição paleobiológica das construções estromatólicas da Lagoa Vermelha RJ, Brasil. *Revista Brasileira de Paleontologia.* 7 (2): 193-198
- SILVA, H.D., WOSNJUK, L.A.C., SANTOS, S.F.O., VILANOVACOSTA, C.A.S.T., PEREIRA, F.C., SILVEIRA-LACERDA, E.P., GARCÍAZAPATA, M.T.A & ANUNCIAÇÃO, C.E. Molecular detection of adenoviruses in lakes and rivers of Goiânia, Goiás, Brazil. *Food and Environmental Virology,* 2: 35-40. 2010.
- SMITH, K.A. Edward Jenner and the small pox vaccine. 2011. *Frontiers in Immunology | Microbial Immunology.* REVIEW ARTICLE. Volume 2. Article 21. p. 1-6. DOI: 10.3389/fimmu.2011.00021.
- SPENCER, R. 1955. A marine bacteriophage. *Nature.* 175:690.
- SUTTLE, C. A., 2005. Viruses in the sea. Nature Publishing Group, 22p
- SUTTLE, C.A. Marine viruses — major players in the global ecosystem *Nature Reviews Microbiology,* 5 (10), 801-812. 2007.

- THINGSTAD, T. Elements of a theory for mechanisms controlling abundance, diversity and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* 45, 1320-1328. 2000.
- THOMPSON, J.R.; MARCELINO, L.A.; POLZ, M. *Oceans and Health: Pathogens in the Marine Environment*. 2005. Book Chapter 2.
- TORRES, M. B; JUNIOR, P.A.H; OURQUIDES, C.L; BOUZON, Z.L. 2009. Composição e distribuição do Macrofitobentos da Lagoa da Conceição, Florianópolis – SC. *INSULA* 38: 58-128.
- TREVOR V. SUSLOW. Oxidation-Reduction Potential (ORP) for Water Disinfection Monitoring, Control, and Documentation. UNIVERSITY OF CALIFORNIA, Division of Agriculture and Natural Resources. 2009. p. 2.
- TUNDISI, J. G.; MATSUMURA TUNDISI, T. *Limnologia*. São Paulo: Oficina de Textos, 2008. 632 p.
- USEPA. Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge Ims cartridge filters and organic flocculation. In: *Manual of Methods for Virology*. EPA/600/4-84/013 N9 (14). Cincinnati: U.S. Environmental Protection Agency. Cap. 14. 2001.
- VALLENTYNE, J.R. *Introducción a la Limnología: Los lagos y el hombre*. Ed. Omega, Barcelona, 1978. 169p
- VENTOSA, A., GUTIÉRREZ, MC; FALSEN, E; ROLLÁN, E; SIMARRO, I; GARCÍA, P; DOMÍNGUEZ, L. "*Pseudomonas simiae* sp. nov., isolated from clinical specimens from monkeys (*Callithrix geoffroyi*)". *Int J Syst Evol Microbiol.* 56 (Pt 11) (Pt 11): 2671–6. 2006.
- VICTORIA, J. G., KAPOOR, A., LI, L., BLINKOVA, O., SLIKAS, B., WANG, C., NAEEM, A., ZAIDI, S. & DELWART, E. Metagenomic analyses of viruses in stool samples from children with acute flaccid paralysis. *J Virol* 83, 4642–4651. 2009.
- VON SPERLING, M. *Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos*. 3.ed. Belo Horizonte: DESA-UFMG, 2005. 452p. (Série: Princípios do tratamento biológico de águas residuárias, v.1).
- WEITZ et al. A multitrophic model to quantify the effects of marine viruses on microbial food webs and ecosystem processes. *The ISME Journal*, 9: 1352-1364. 2015.
- WILDY P, Herpes: history and classification. In: Kaplan AS, ed. *The herpes- viruses*. New York: Academic Press, 1973:1–25.

- WILHELM, S.W. AND SUTLE, C.A, 1999. Viruses and Nutrient Cycles in the Sea: Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs. *BioScience* Vol. 49 No. 10.781-788.
- WITTEBOLE, X., DE ROOCK, S., & OPAL, S. M. (2014). A historical overview of bacteriophage therapy as an alternative to antibiotics for the treatment of bacterial pathogens. *Virulence*, 5(1), 226–235. <http://doi.org/10.4161/viru.25991>.
- WOMMACK, K.E; COLWELL, R.R. Virioplankton: Viruses in Aquatic Ecosystems. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* vol. 64 no. 1 69-1141. 2000.
- XIA H., DENG F., HU Z., 2013. Freshwater cyanophages. *Virologica Sinica*. Volume 28, Issue 5, pp 253-259. 2013.
- ZOBELL, C.E. 1946. *Marine Microbiology*, Chronica Botanica Co., Waltham, Mass, USA, 240.

## 8. ANEXOS

8.1. Autorização de Pesquisa Científica para a Unidade de Conservação Parque Estadual da Costa do Sol nº. 002/2015 concedida pelo INEA.

  
GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO  
SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE - SEA  
INSTITUTO ESTADUAL DO AMBIENTE - INEA

**AUTORIZAÇÃO DE PESQUISA CIENTÍFICA INEA Nº 002/2015**

**AUTORIZAÇÃO PARA PESQUISA CIENTÍFICA**  
**EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO**

O Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas do Instituto Estadual do Ambiente – INEA, no uso de suas atribuições legais, considerando a Portaria IEF/RJ/PR nº 227 de 18/12/2007 e considerando, ainda, o que consta no procedimento administrativo E-07/002.16232/2014, **AUTORIZA** a pesquisadora **MIRIAN ARAUJO CARLOS CRAPEZ**, vinculada à Universidade Federal Fluminense - UFF, e sua equipe, Elisamara Sabadini Santos, Carolina Neumann Keim, José Augusto Pires Bitencourt, Simone Pennafirme Ferreira, Daniel Dias Loureiro, Guilherme Oliveira Andrade da Silva e Lorena da Graça Pedrosa de Macena, a obter dados no Parque Estadual da Costa do Sol - PECS, com vistas à execução do projeto de pesquisa "**Esteiras microbianas em ambientes hipersalinos – subsídios para conservação ambiental**", devendo ser observadas as condições discriminadas no verso deste documento e ainda aquelas previstas na Portaria supracitada.

A presente autorização tem validade de **10 (dez) meses** a partir da data de sua assinatura.

Rio de Janeiro, 23 de *Jan* de 2015.

  
\_\_\_\_\_  
**Guido Gelli**  
**Diretor de Biodiversidade e Áreas Protegidas**

  
GOVERNO DO Rio de Janeiro SECRETARIA DE ESTADO DO AMBIENTE **inea** instituto estadual do ambiente  
Avenida Venezuela, 110 – Saúde – Rio de Janeiro - RJ-CEP: 20081-312 – Tel: 2332-4640  
www.inea.gov.br

8.2. Parâmetros estabelecidos pelo CONAMA 357/2005 como padrão de qualidade em águas salinas classe 1 (BRASIL, 2005).

PARÂMETROS	VALORES
pH	Entre 6,5 a 8,5
O.D	$\geq 6,0$ (mg/L)
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	$\leq 0,07$ (mg/L)
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	$\leq 0,40$ (mg/L)
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	$\leq 0,031$ (mg/L)
PT	$\leq 0,062$ (mg/L)