

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA APLICADA AO MANEJO  
E CONSERVAÇÃO DE RECURSOS NATURAIS - PGECOL

IMPLICAÇÕES LIMNO-ECOLÓGICAS DERIVADAS DA INFECÇÃO VIRAL NO  
PLÂNCTON

NATHAN OLIVEIRA BARROS

Orientador: Prof. Dr. Fábio Roland

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Rossana Melo

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada a Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

JUIZ DE FORA, MG – Brasil

MAIO DE 2008

# IMPLICAÇÕES LIMNO-ECOLÓGICAS DERIVADAS DA INFECÇÃO

## VIRAL NO PLANCTON

NATHAN OLIVEIRA BARROS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Ecologia Aplicada a Conservação e Manejo de Recursos Naturais.

---

Dr. Fábio Roland

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr. Vinícius Fortes Farjalla

Universidade Federal do Rio de Janeiro

---

Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Soares

Universidade Federal de Juiz de Fora

---

Dr<sup>a</sup>. Rossana C. N. Melo

Universidade Federal de Juiz de Fora

FICHA CATALOGRÁFICA

BARROS, NATHAN OLIVEIRA

Implicações limno-ecológicas derivadas da infecção  
viral no plâncton

82p.:14 figuras e 3 tabelas

Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008

Dissertação de Mestrado, PGECOL

**Orientador:**

**Dr. Fábio Roland**

**Co-orientadora:**

**Dr<sup>a</sup>. Rossana Melo**

## HOMENAGEM

Uma pomba representa muito mais do  
que a paz... A você meu irmão, meu  
eterno anjo da guarda.

Aos meus pais, minha irmã e  
meus amigos, eu dedico  
este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Fábio Roland pelo apoio incondicional ao desenvolvimento deste trabalho, por fazer parte da minha formação humana, profissional e científica. Por me possibilitar conhecer e desenvolver pesquisa na Amazônia. Muito obrigado por tudo, principalmente pela amizade e pelos conselhos...

A Dr. Rossana Melo por me inserir no mundo da microscopia eletrônica. Por ser um exemplo de pesquisadora, pela paciência e vontade de transmitir o conhecimento.

Ao Marcos Paulo Barros um verdadeiro irmão e conselheiro. Obrigado pelo auxílio no trabalho de campo, pela disponibilização de dados e pelos debates científicos. Valeu camarada!

Aos amigos do Laboratório de Ecologia Aquática, minha segunda família e com quem passei grande parte do meu tempo durante o trabalho: Alessandro, Anderson, Caique, Felipe, Gladson, Guilherme, Lúcia, Luciana, Marcela, Mariana, Natália, Raquel, Rafael, Raphaela, Simone. Obrigado por tudo!

A Mineração Rio do Norte pelo auxílio financeiro para a realização do trabalho.

Aos amigos de Porto Trombetas que não pouparam esforços para a realização do trabalho: Glariston (Duda), Marcos Tosi, Ronilson (Magrão), Caique, Felipe, Lúcia, Marcos Paulo, e João Leal pelo apoio e pela logística durante o trabalho de campo.

A equipe dos “trocentos lagos” Lucia, Vinicius, Marquinho, Aline e o pessoal de apoio. Muito obrigado pelos cinco dias de profundo mergulho na ciência e no mundo Amazônico.

Aos professores Dr. Francisco Esteves e Dr. Reinaldo Bozelli, por possibilitarem o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus tios e primos que mesmos a distância estiveram sempre ao meu lado e me apoiaram.

E por fim, a minha família, minha mãe Bete, minha irmã Shaira, meu pai Gelinho, por estarem sempre ao meu lado e por suportarem minhas ausências. Obrigado mãe por ser uma fonte de inspiração, obrigado pai por me ensinar a ver a vida com outros olhos.



## SUMÁRIO

Índice de Figuras .....	11
Índice de Tabelas .....	14
Resumo .....	11
Abstract .....	16
Introdução geral.....	17
O que são vírus.....	17
Os vírus e a cadeia aquática planctônica .....	18
Implicações dos vírus nas comunidades planctônicas.....	21
Efeitos Biogeoquímicos.....	24
Capítulo 1 .....	28
Resumo.....	29
Introdução.....	30
Objetivo.....	33
Hipóteses .....	33
Área de Estudo .....	34
Métodos .....	35
Amostragem e preservação.....	35
Quantificação da abundância de vírus e bactéria.....	35
Preparação de amostras para Microscopia Eletrônica .....	36
Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	37
Análise estatística.....	38
Resultados .....	39
Abundância de Vírus e Bactérias.....	39
Análise da microscopia Eletrônica de Transmissão .....	41
Discussão .....	42
Capítulo 2 .....	555

Resumo.....	56
Introdução.....	57
Objetivo.....	59
Hipótese.....	599
Área de Estudo .....	60
Métodos .....	60
Amostragem e preservação.....	60
Quantificação da abundância de vírus e bactéria .....	61
Quantificação da abundância de vírus e bactéria.....	611
Morfologia dos lagos .....	62
Análise estatística.....	62
Resultado.....	63
Discussão .....	64
Discussão Geral .....	76
Referências .....	799

## Índice de Figuras

- 1 Caminhos da infecção viral. Uma vez dentro da célula os vírus podem seguir dois caminhos: i) o DNA viral incorpora-se ao DNA da célula infectada, isto é, o DNA viral torna-se parte do DNA da célula infectada. Uma vez infectada, a célula continua suas operações normais, como reprodução e ciclo celular. 19
- 2 A alça Viral no plâncton. Esquema de uma cadeia trófica de ambientes aquáticos, enfatizando o circuito conectando procariotos, vírus e a matéria orgânica dissolvida. A lise causada pela ação dos vírus nas bactérias disponibiliza matéria orgânica dissolvida que são reaproveitadas por outras bactérias. Os vírus e os detritos celulares estão separados para ilustração, mas eles são freqüentemente definidos operacionalmente como matéria orgânica dissolvida. Esquema adaptado de (FUHRMAN, 1999). 25
- 3 Localização da região amostrada. O Lago Batata é um lago de inundação do Rio Trobetas, próximo ao distrito de Porto Trombetas, município de Oriximiná, estado do Pará, Brasil. Pode-se distinguir duas áreas diferentes dentro do lago: i) impactada por rejeito de bauxita (cinza escuro); ii) sem influência do rejeito (cinza claro). 49
- 4 Série temporal de turbidez medida no Lago Batata na estação natural (pontos pretos) e na estação impactada (pontos brancos). Note o real decaimento da turbidez na estação impactada ao longo dos anos, o que pode diminuir a influência deste parâmetro nas comunidades presentes nesta estação. 50
- 5 Abundância de Vírus e Bactérias nas estações amostradas durante os quatro períodos do pulso de inundação: E – Enchente; AA – Águas altas; V – Vazante e AB – Águas Baixas. As letras entre parêntese mostram os resultados do teste de médias, os períodos não representados pela mesma letra são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $n = 18$ ). As linhas das caixas representam a mediana, as caixas, os traços e representam respectivamente 75 e 95% dos dados, os pontos são dados discrepantes. 51

- 6 Variação do número de vírus e bactérias (A) no Lago Batata. A abundância de vírus superou em cerca de uma ordem de grandeza a abundância bacteriana. Em (B), observa-se a forte correlação entre vírus e bactérias no Lago Batata. 52
- 7 Variação da razão vírus/bactérias (VBR) no Lago Batata durante os períodos de Enchente (E); Águas Altas (AA); Vazante (V) e Águas Baixas (AB). As letras entre parêntese no interior do gráfico mostram os resultados do teste de médias, o período de vazante é significativamente diferente dos outros períodos ( $p < 0.05$ ). As linhas das caixas representam a mediana, as caixas, os traços e representam respectivamente 75 e 95% dos dados, os pontos são outliers. 53
- 8 Micrografia Eletrônica, obtida em microscópio eletrônico de transmissão, de bactérias de um ecossistema aquático amazônico (Lago Batata). A e B mostram bactérias não infectadas. Estruturas bacterianas como o citoplasma (c), o nucleóide (n), o espaço periplasmático (\*) e a cápsula externa (setas) foram claramente observadas. Em A, dois tipos distintos de bactérias são mostrados no mesmo campo. Note a espessura variável da cápsula bacteriana (pontas de setas), alta e densa em A comparada com B. A área do retângulo marcado em B está ampliada na parte de baixo da mesma figura. Note que a célula apresenta parede celular muito eletrônica abaixo da cápsula. C é uma bactéria infectada com muitos fagos. Um desses vírus é mostrado em grande aumento (quadrado). Note que o capsídio é composto de repetitivas unidades morfológicas (em destaque em azul, grande aumento). A membrana celular, com típica estrutura trilaminar, é parcialmente observada (seta). Escala: barra, 460 nm (A, B); 300 nm (B, alta ampliação); 266 nm (C); 80 nm (C, vírus em alta ampliação); 40 nm (C, vírus em alta ampliação, destacado em azul). 54
- 9 Variação do nível do rio Trombetas nos anos de 2005, 2006 e 2007. A seta indica o momento das coletas realizadas nos lagos do rio Trombetas durante o ano de 2007, note que no momento das coletas o nível do rio já estava subindo. 72

- 10      Localização dos lagos amostrados. 73
- 11      Variação do número de vírus, bactérias e da VBR. (A) Abundância de vírus (barras cinzas), bactérias (barras pretas) nos lagos amostrados. O número de vírus superou em cerca de uma ordem de grandeza o número de bactérias. (B) Apesar da grande variabilidade do número de vírus e bactérias, a VBR foi praticamente constante ao longo dos lagos, a linha representa a média dos valores ( $4,67 \pm 1,41$ ). 74
- 12      Correlação entre a abundância viral e a abundância bacteriana. Uma vez que a abundância de vírus está relacionada a abundância bacteriana, é possível dizer que a maioria dos vírus presentes nos lagos do rio Trombetas são bacteriófagos e por tanto estão vulneráveis a parâmetros que possam influenciar a abundância bacteriana. 75
- 13      Distribuição da abundância viral e bacteriana em lagos eutróficos e mesotróficos. A abundância viral e bacteriana foi significativamente maior em lagos com concentração de fósforo acima de  $30 \mu\text{g L}^{-1}$  lagos eutróficos, do que em lagos com concentração de fósforo menor do que  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , lagos mesotróficos. 76

## Índice de Tabelas

1	Abundância de vírus e bactérias em ecossistemas aquáticos.	21
2	Caracterização das estações amostradas no Lago Batata.	48
3	Caracterização dos lagos amostrados no rio Trombetas durante o período de águas baixas.	70

## Resumo

Os vírus são descritos como sendo os organismos mais abundantes e dinâmicos dos ecossistemas aquáticos, eles podem influenciar tanto a composição das comunidades quanto processos biogeoquímicos e ecológicos nestes ambientes. Os vírus são responsáveis por grande parte da mortalidade bacteriana e fitoplanctônica, pelo término de florações e pelo aumento da disponibilidade de carbono e nutrientes. Muitos trabalhos reportam sobre a ecologia de vírus em ambientes aquáticos temperados, entretanto para ambientes tropicais, até o presente momento existem apenas dois trabalhos. O objetivo deste trabalho foi avaliar a abundância de vírus e bactérias em sistemas aquáticos amazônicos, bem como as interações entre estas duas comunidades. Para isso foi utilizado técnicas de microscopia eletrônica e microscopia de luz. O número de vírus (VLP) variou tanto em escala temporal quanto em escala espacial, no entanto, a razão entre vírus e bactérias (VRB) se manteve estável. Em uma escala espacial a VBR esteve inversamente correlacionada com a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), sugerindo que lagos húmicos apresentam menor taxa de mortalidade bacteriana causada por vírus. Em média 20% das bactérias estavam infectadas com um número médio de 10 fagos por célula. O número de vírus esteve relacionado à disponibilidade de fósforo, à profundidade do lago, à entrada de luz e, principalmente à densidade bacteriana. Nossos dados são fortes evidências de que também nos ecossistemas amazônicos a maioria dos vírus são bacteriófagos e, portanto, possuem um papel fundamental no controle da comunidade bacteriana, na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia.

## **Abstract**

Virus are described as the most abundant and dynamic organisms in the aquatic environment, influencing communities composition and biogeochemical and ecological processes. These organisms are responsible for great part of the bacterial and phytoplanktonic mortality, for algal blooms decrease and for increasing the nutrients and carbon availability. Many previous works approach the viral ecology in temperate aquatic ecosystems, although there are only two references for the tropical area. The goal of this work was to determine the viral and bacterial abundances in Amazonian aquatic systems, as well as to evaluate the interactions between these groups. In order to achieve it, optical and electronic microscope techniques were applied. The number of viruses (VLP) varied both in temporal and in spatial scales, even though the virus/bacteria ratio was kept unaltered. In a spatial scale, VRB was correlated to the dissolved organic carbon (COD) concentration, suggesting that humic lakes present reduced rate of bacterial mortality caused by virus. In average, 20% of the bacteria were infected by 10 phagos per cell. The VLP was correlated to phosphorus availability, lake depth, light penetration, and mainly bacterial abundance. We suggest that most of the virus in Amazonian aquatic ecosystems are bacteriophages and, hence, that they play a fundamental role in controlling the bacterial community, in nutrient cycling and in energy flux.



## **Introdução geral**

### **O que são os vírus?**

Os vírus são as menores entidades biológicas conhecidas, com uma estrutura biológica relativamente simples, basicamente um ácido nucléico, RNA ou DNA (com uma ou duas bandas) envolto por uma cápsula de proteína. Apesar dessa estrutura simples, os vírus são provavelmente as criaturas mais diversas do planeta. Vírus podem, teoricamente, infectar todos os tipos de organismos vivos e possuem tamanho variável entre 20 e 200 nanômetros. Sua replicação acontece exclusivamente na invasão e posse do controle da maquinaria de auto-reprodução celular, por isso, também são chamados de parasitas intracelulares obrigatórios. Em ambientes aquáticos, os vírus 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 a sua replicação. Uma vez dentro da célula hospedeira os vírus podem seguir dois caminhos: (i) se multiplicar e acompanhar a divisão da célula; (ii) se multiplicar e causar a ruptura da célula hospedeira sendo liberados novamente para o meio. O termo vírus geralmente refere-se às partículas que infectam eucariontes (organismos cujas células têm carioteca), enquanto o termo bacteriófago ou fago é utilizado para descrever aquele que infecta procariontes (domínio bactéria e archaea). Na maioria dos sistemas aquáticos as partículas virais são bacteriófagos.

## **Os vírus e a cadeia aquática planctônica.**

A importância dos processos microbianos nos ecossistemas aquáticos teve um grande aumento nas últimas três décadas. Atualmente está claro que uma grande proporção do fluxo de matéria e energia da cadeia trófica passa por esses organismos por meio da matéria orgânica dissolvida (FUHRMAN, 1999). A cadeia microbiana aquática era dita como completa até duas décadas atrás, até então, as bactérias eram os menores e mais abundantes organismos e exerciam um papel fundamental na ciclagem dos nutrientes para os outros níveis tróficos.

O interesse pelo papel ecológico dos vírus nos ambientes aquáticos só começou quando Bergh (BERGH, et al., 1989) mostrou que eles excedem as bactérias em cerca de uma ordem de grandeza. Outros estudos (PROCTOR e FUHRMAN, 1990, SUTTLE, et al., 1990) também mostraram que os vírus são os componentes mais abundantes e dinâmicos do ecossistema aquático, que possuem um papel fundamental na cadeia microbiana e que são agentes significantes no controle das bactérias e do fitoplâncton.

Os vírus podem infectar bactérias e produtores primários. Uma vez dentro da célula hospedeira, dependendo das condições ambientais, eles podem seguir por dois caminhos distintos: i) ciclo lisogênico – O ácido nucléico do genoma viral passa a fazer parte do genoma da célula hospedeira e a acompanhar o desenvolvimento e a duplicação celular, sem que haja a lise da célula hospedeira. ii) ciclo lítico – os vírus atacam a célula hospedeira e injetam o seu ácido nucléico dentro desta célula, passando a dirigir a célula infectada e

a se multiplicar. Eles são então liberados para o meio extracelular após o rompimento da célula hospedeira (lise celular) reiniciando o ciclo novamente. Perturbações ambientais na célula hospedeira podem fazer com que o ciclo lisogênico se transforme em um ciclo lítico. (Figura 1).

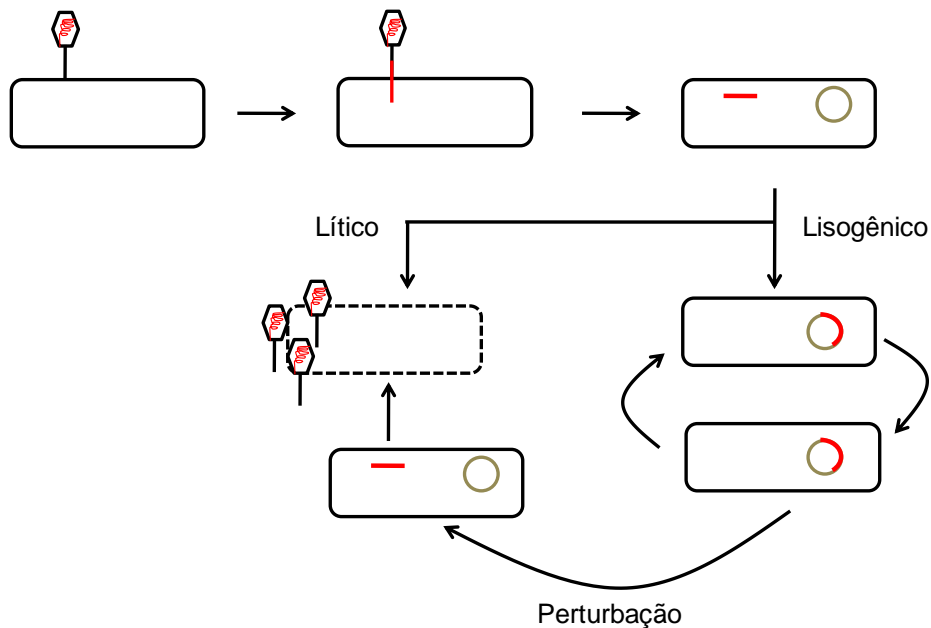


Figura 1 – Caminhos da infecção viral. Uma vez dentro da célula os vírus podem seguir dois caminhos: i) o DNA viral incorpora-se ao DNA da célula infectada, isto é, o DNA viral torna-se parte do DNA da célula infectada. Uma vez infectada, a célula continua suas operações normais, como reprodução e ciclo celular. Durante o processo de divisão celular, o material genético da célula, juntamente com o material genético do vírus que foi incorporado, sofre duplicação e em seguida são divididos equitativamente entre as células-filhas. Assim, uma vez infectada, uma célula começará a transmitir o vírus sempre que passar por mitose e todas as células estarão infectadas também. ii) No ciclo lítico, o vírus invade a bactéria, onde as funções normais desta são interrompidas na presença de ácido nucléico do vírus (DNA ou RNA). Esse, ao mesmo tempo em que é replicado, comanda a síntese das proteínas que compõem o capsídeo. Os capsídeos organizam-se e envolvem as moléculas de ácido nucléico. São produzidos, então, novos vírus. Em seguida, ocorre a lise, a célula infectada rompe-se e os novos vírus são liberados.

A lise celular causada por vírus faz com que todo o conteúdo (nitrogênio, fósforo e carbono) que estava no interior da célula hospedeira retorne para o meio extracelular. Estes nutrientes são fontes para o crescimento de outras bactérias heterotróficas, uma vez que são mais fáceis de serem aproveitadas por esses organismos em comparação as outras fontes de nutrientes (FUHRMAN, 1999).

Os vírus possuem uma abundância típica entre  $10^4$  e  $10^8$  VLP por mL, superando as bactérias cerca de uma ordem de grandeza (BERGH, et al., 1989, FUHRMAN, 1999, PROCTOR e FUHRMAN, 1990). Estudos sobre a ecologia de vírus têm sido realizados nos mais diversos ecossistemas aquáticos, desde sistemas eutrofizados (BERGH, et al., 1989) até ambientes extremos como lagos da antártica (KEPNER, et al., 1998) (Tabela 1).

Na última década, muitos estudos mostraram que os vírus podem influenciar na abundância e composição das espécies, a diversidade da comunidade microbiana, na ciclagem de nutrientes e o fluxo de energia (FUHRMAN e NOBLE, 1995, PROCTOR e FUHRMAN, 1992).

Tabela 1 – Abundância de vírus e bactérias em ecossistemas aquáticos.

ARTIGO	Ambiente	Ecossistema	VLP	BACTÉRIA
Alonso (2001)	-	-	2,6 X 10 <sup>3</sup> a 8,1 X 10 <sup>4</sup>	1,9 X 10 <sup>4</sup> a 5.5 X 10 <sup>5</sup>
Anésio (2004)	-	-	1,2 X 10 <sup>7</sup> a 2,4 X 10 <sup>7</sup>	0,2 X 10 <sup>6</sup> a 1,1 X 10 <sup>6</sup>
Bettarel (2006)	Água Doce	Lake Retba	72,0 X 10 <sup>7</sup>	134 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Djoudj Pond	3.9 X 10 <sup>7</sup>	5.3 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Djeuss Stream	1.1 X 10 <sup>7</sup>	2.7 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Diana Dam	1.5 X 10 <sup>7</sup>	1.1 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Bango Reservoir	1.9 X 10 <sup>7</sup>	2.9 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Lake Guiers (NG)	2.7 X 10 <sup>7</sup>	7.7 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Lake Guiers (KMS)	3.8 X 10 <sup>7</sup>	8.5 X 10 <sup>6</sup>
Heldal (1991)	Água Doce	Bergen Harbour	5.9 X 10 <sup>7</sup>	2.9 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Raunefjorden	1.1 X 10 <sup>7</sup> a 3.5 X 10 <sup>7</sup>	0.7 X 10 <sup>6</sup> a 1.5 X 10 <sup>6</sup>
Hennes (1995)	Água Doce	Lake Kalandsvannet	1.9 X 10 <sup>7</sup> a 20.2 X 10 <sup>7</sup>	0.8 X 10 <sup>6</sup> a 4.1 X 10 <sup>6</sup>
	Marinho	Golfo do México	28.3 X 10 <sup>7</sup>	3.5 X 10 <sup>6</sup>
	Água Doce	Lake Austin	14.2 X 10 <sup>7</sup>	
Liu (2006)	Marinho	Barton Springs	0.53 X 10 <sup>7</sup>	
	Marinho	Port Aransas water supply	0.18 X 10 <sup>7</sup>	
	Marinho	Lake Donghu - site Hipereutrófico	7.43 X 10 <sup>8</sup> a 2.04 X 10 <sup>9</sup>	1.36 X 10 <sup>7</sup> a 4.90 X 10 <sup>7</sup>
Bergh et al 1989	Água Doce	Lake Donghu - site eutrófico	5.82 X 10 <sup>8</sup> a 1.99 X 10 <sup>9</sup>	8.31 X 10 <sup>6</sup> a 5.14 X 10 <sup>7</sup>
	Água Doce	Lake Donghu - site mesotrófico	5.48 X 10 <sup>8</sup> a 1.54 X 10 <sup>9</sup>	7.87 X 10 <sup>6</sup> a 4.36 X 10 <sup>7</sup>
	Marinho	Chesapeake Bay	10.1 X 10 <sup>6</sup>	3.2 X 10 <sup>6</sup>
	Marinho	Korsfjorden	6.1 X 10 <sup>6</sup>	1.1 X 10 <sup>6</sup>
Cochlan et al. 1993	Marinho	Raunefjorden, Western Norway	9.9 X 10 <sup>6</sup>	0.2 X 10 <sup>6</sup>
	Marinho	North Atlantic	14.9 X 10 <sup>6</sup>	0.3 X 10 <sup>6</sup>
	Marinho	Barents Sea	0.06 X 10 <sup>6</sup>	0.02 X 10 <sup>6</sup>
Maranger et al. 1994	Marinho	Southern California Bight, USA	1.1 - 12.4 X 10 <sup>6</sup>	
	Marinho	Gulf of Bothnia, Sweden	17.5 - 52.2 X 10 <sup>6</sup>	
Steward et al. 1996	Marinho	Arctic Sea Ice, Canadian Arctic	9 - 130 X 10 <sup>6</sup>	0.15 - 10 X 10 <sup>6</sup>
Hara et al. 1996	Marinho	Bering & Chukchi Seas	2.5 - 36 X 10 <sup>6</sup>	0.21 - 2.1 X 10 <sup>6</sup>
Guixa-Boixereu et al. 1999	Marinho	North Pacific, Subarctic zone	0.06 - 3.8 X 10 <sup>6</sup>	0.04 - 0.94 X 10 <sup>6</sup>
Maranger & Bird 1995	Marinho	Mediterranean Sea	5 - 30 X 10 <sup>6</sup>	
Hennes & Simon 1995	Água Doce	22 freshwater lakes from Québec, Canada	41 - 250 X 10 <sup>6</sup>	0.023 - 14 X 10 <sup>6</sup>
Kepner & Wharton 1998	Água Doce	Lake Constance, Germany	10 - 40 X 10 <sup>6</sup>	
Weinbauer & Höfle 1998	Água Doce	4 lakes in Taylor Valley, Antarctica	4.2 - 33.5 X 10 <sup>6</sup>	1.3 - 4.3 - 14 X 10 <sup>6</sup>
Wilhelm & Smith 2000	Água Doce	Lake Plußsee, West Germany	13 - 43 X 10 <sup>6</sup>	4.6 - 7.7 X 10 <sup>6</sup>
Tapper and Hicks 1998	Água Doce	Lake Erie	37-379 X 10 <sup>6</sup>	1.8 - 4.6 X 10 <sup>6</sup>
Wilson et al. 2000	Água Doce	Lake Superior	1.5-9.2 X 10 <sup>6</sup>	1.2 - 18.3 X 10 <sup>6</sup>
Laybourn-Parry et al. 2001	Água Doce	10 freshwater lakes on Signy	4.9 - 31 X 10 <sup>6</sup>	1.6 - 7.6 X 10 <sup>6</sup>
Hofer & Sommaruga 2001	Água Doce	5 freshwater lakes and 4 saline lakes, Vestfold	1.01 - 36.5 X 10 <sup>6</sup>	
	Água Doce	Lake Gossenköllesee, Austria	0.02 - 4.6 X 10 <sup>6</sup>	

## Implicações dos vírus nas comunidades planctônicas

Os vírus têm sido reconhecidos como os componentes numericamente mais dominantes em ambientes marinhos e de água doce. Muitos estudos relatam que a infecção viral nas bactérias e subsequente lise celular são responsáveis por uma significativa proporção da mortalidade bacteriana tanto

em ambientes marinhos quanto em ambientes de água doce (HENNES e SIMON, 1995, PROCTOR e FUHRMAN, 1990, STEWARD, et al., 1996, WEINBAUER e PEDUZZI, 1995). Em geral, estima-se que os vírus são responsáveis por cerca de 10 a 50% pela morte do número total de bactérias na superfície dos ambientes aquáticos e de 50 a 100% em ambientes hostis à presença dos protistas, como ambientes com pouco oxigênio. Outros estudos mostram que a lise viral causa danos a comunidade bacteriana, semelhantes aos causados pela predação do zooplâncton (FUHRMAN e NOBLE, 1995, PROCTOR e FUHRMAN, 1990). Desta forma os vírus possuem um significativo efeito na mortalidade bacteriana, às vezes maior do que a predação pelo zooplâncton. Alguns estudos indicam que os vírus são relativamente mais importantes em ambientes eutróficos do que em ambiente oligotróficos (BETTAREL, et al., 2004). Por exercerem o controle sobre a população bacteriana, os vírus podem também ter um importante papel na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia (FUHRMAN, 1999).

É sabido que o crescimento bacteriano nos ambientes naturais pode ser limitado por nutrientes e pela predação do zooplâncton. Entretanto, estes limitadores não são específicos para uma determinada população bacteriana, pelo contrário, eles afetam a comunidade bacteriana como um todo. Os vírus por outro lado, são parasitas específicos, por isso, eles conseguem alterar a composição da comunidade e não a comunidade por inteiro (FUHRMAN, 1999, SUTTLE, 1994). Esta especificidade aparente da relação vírus/bactéria é fundamental no controle das populações dominantes. Se uma espécie dominante sofre um ataque viral, a densidade desta espécie tende a reduzir, propiciando condições para o desenvolvimento de outras espécies. A

especificidade viral vem sendo descrito como um importante mecanismo para a manutenção da alta diversidade de bactérias e algas.

O conhecimento sobre a interação entre vírus e o fitoplâncton é menor em relação à interação entre vírus e o bacterioplâncton. Entretanto, o potencial impacto dos vírus sobre o fitoplâncton é grande, uma vez que as algas são a base da cadeia alimentar nos ambientes aquáticos. Poucos estudos têm mostrado o efeito geral dos vírus nestes organismos. Já se sabe que o aumento de 20% do número de vírus nos ambientes aquáticos reduz em 50% a biomassa fitoplanctônica e a produção primária (HEWSON, et al., 2001, SUTTLE, et al., 1990). Existe uma forte evidência de que a abundância viral infecta uma significativa proporção da comunidade fitoplanctônica. Os vírus que atacam cianobactérias (cianofágos) são responsáveis pela morte de uma pequena proporção de cianobactérias comparado aos danos causados na comunidade bacteriana. Existem relatos que mostram que entre 5 a 15% da cianobactérias no Golfo do México sofrem lise por cianofágos por dia (SUTTLE, 1994) e em menor porcentagem, aproximadamente 3% por dia, ocorre a lise de *Synechococcus* em águas temperadas do atlântico (WATERBURY e VALOIS, 1993).

Dada a especificidade da infecção viral nas comunidades hospedeiras, é esperado que esta seja predominante nas florações algais, onde o número de indivíduos da espécie hospedeira/dominante é abundante. Muitos estudos indicam que a infecção viral pode ser um importante controlador e na prevenção das florações fitoplanctônicas, mesmo que todas as outras

condições possam ser favoráveis (BRUSSAARD, 2004, MARANGER, et al., 1994, ORTMANN, et al., 2002, RUARDIJ, et al., 2005).

### ***Efeitos Biogeoquímicos***

Além dos efeitos letais dos vírus nas comunidades microbianas, a atividade viral pode também afetar a ciclagem de carbono e nutrientes em ecossistemas aquáticos. A lise causada pelos vírus em organismos heterotróficos e autotróficos libera componentes ricos em carbono, nitrogênio e fósforo para o meio extracelular. Após a lise qual o provável destino do material liberado pela ruptura da célula? É muito razoável assumir que grande parte do produto da lise celular torna-se imediatamente disponível para as bactérias (PROCTOR e FUHRMAN, 1990). Se a célula que sofreu lise for uma bactéria, então a disponibilidade do produto da lise para as bactérias representa um curto-circuito, onde a biomassa bacteriana é consumida primariamente por outra bactéria. Este ciclo denominado de “alça viral” é realimentado externamente pela liberação de matéria orgânica dissolvida vinda do fitoplâncton e dos protistas (Figura 2). Sabendo que existe perda na respiração e reaproveitamento de nutrientes inorgânicos associados com o uso de substâncias orgânicas dissolvidas, este circuito tem um efeito chave na oxidação da matéria orgânica e no reaproveitamento de nutrientes inorgânicos.



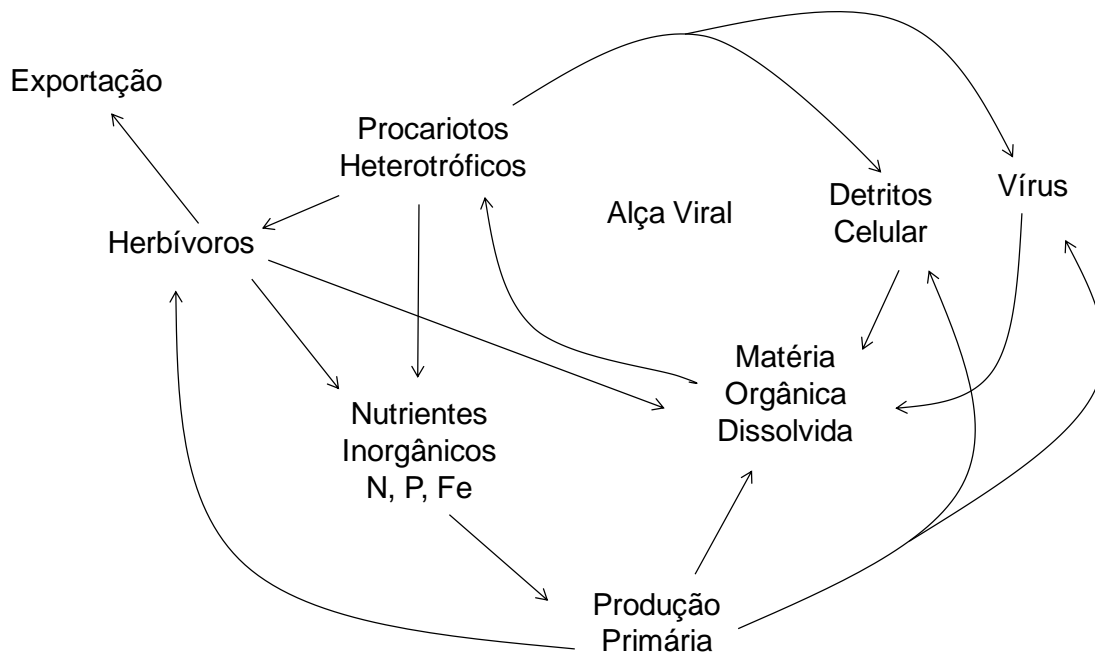


Figura 2 – A alça Viral no plâncton. Esquema de uma cadeia trófica de ambientes aquáticos, enfatizando o circuito conectando procariotos, vírus e a matéria orgânica dissolvida. A lise causada pela ação dos vírus nas bactérias disponibiliza matéria orgânica dissolvida que são reaproveitadas por outras bactérias. Os vírus e os detritos celulares estão separados para ilustração, mas eles são freqüentemente definidos operacionalmente como matéria orgânica dissolvida. Esquema adaptado de (FUHRMAN, 1999).

Por serem agentes que têm o potencial para causar infecção em todos os microorganismos, os vírus têm um impacto significativo na mortalidade microbiana e no ciclo biogeoquímico em todas as escalas (local, regional e global). Este processo apesar de muito simples, já está sendo descrito como importante para a manutenção do ecossistema aquático (FUHRMAN, 1999). De fato, a lise viral pode ser um mecanismo chave para suprir o carbono para bactérias heterotróficas, especialmente em ambientes oligotróficos, onde a produção primária é pequena.

Existe uma grande abundância de vírus em ecossistemas aquáticos, mas as questões agora são, se todos os vírus presentes podem causar infecção nas comunidades planctônicas e quais fatores podem causar a diminuição da abundância viral. A contagem direta de vírus em microscopia de epifluorescência não indica quanto das partículas virais são infecciosas, outros tipos de pesquisas, com base na microscopia eletrônica e nas técnicas de plaqueamento têm sido usadas para determinar a taxa de infecção viral. Muitos estudos estão sendo feitos com o sistema vírus-hospedeiro para estabelecer quais parâmetros estão envolvidos na queda da abundância dos vírus (NOBLE e FUHRMAN, 1997, WOMMACK, et al., 1996). Já se sabe que eles apresentam sensibilidade a vários tipos de estresses ambientais que os levam à inativação e a redução das infecções. A queda na abundância em ecossistemas aquáticos é causada primariamente pela radiação solar (NOBLE e FUHRMAN, 1997, WOMMACK, et al., 1996), pois os vírus não possuem pigmentação, mas apenas uma fina camada protéica que torna o material genético vulnerável aos danos causados pela radiação solar.

Ambientes marinhos tendem a apresentar maior abundância de vírus do que ambientes de água doce (Tabela 1). Na maioria dos sistemas a razão vírus bactérias (VBR) é maior do que um, variando entre 5 e 83 em amostras de ambientes marinhos (WEINBAUER, et al., 1993), e entre 5 e 20 em ambientes de água doce (MATHIAS, et al., 1995). Baixos valores de VBR podem indicar baixas taxas de infecção, um número pequeno de vírus para cada célula hospedeira bacteriana ou alta taxa de decaimento do número de vírus. A VBR é uma medida da relação entre a população de vírus e bactérias, e fornece

uma indicação da multiplicidade de infecção (MOI), com o número médio de fagos por bactérias. Baixa MOI significa menor quantidade de fagos por bactérias e o inverso também é verdadeiro, alta MOI sugere grande quantidade de fagos por bactérias (LENSKI, 1988). Valores elevados de VBR podem indicar a alta taxa de produção viral ou pequeno decaimento do número de vírus ou que existe uma alta taxa de MOI onde mais de um vírus ataca a mesma célula hospedeira (LENSKI, 1988).

## Capítulo 1

Interações entre vírus e bactérias em um lago amazônico de águas claras  
impactado por rejeito de bauxita

Nathan O. Barros<sup>1</sup>

Rossana C. N. Melo<sup>2</sup>

Fábio Roland<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Ecologia Aquática e <sup>2</sup> Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil;

\*Endereço de Correspondência: Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Biologia, Campus, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Telefone: +55 32 3229 3206 ext. 223

Fax: +55 32 3229 3226

## Resumo

Os vírus são os componentes mais abundantes e dinâmicos dos ambientes aquáticos. Eles superam a abundância bacteriana em cerca de uma ordem de grandeza e influenciam processos ecológicos e biogeoquímicos, entre eles, a abundância e distribuição de espécies e a ciclagem de nutrientes. Diversos trabalhos abordam a ecologia de vírus em sistemas temperados; no entanto estudos em sistemas tropicais com esse enfoque ainda são reduzidos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar as interações entre vírus e bactérias em um Lago Amazônico de águas claras impactado por rejeito de bauxita (Lago Batata) através do uso de microscopia de epifluorescência e eletrônica de transmissão (MET). A abundância de vírus e bactérias, no lago, foi afetada pela turbidez causada pelo lançamento de rejeito. Observou-se uma relação inversa entre a abundância de vírus e profundidade. A abundância de vírus foi fortemente correlacionada à abundância bacteriana, sugerindo que os vírus presentes no lago são bacteriófagos e respondem às perturbações causadas na comunidade bacteriana. Análises por MET demonstraram que cerca de vinte por cento das bactérias estavam infectadas com em média de 10 fagos por secção celular. Os resultados apresentados evidenciam o papel dos vírus na regulação das bactérias em ecossistemas aquáticos amazônicos. Eles mostram ainda que a turbidez causada pelo lançamento do rejeito de bauxita no Lago Batata influencia de maneira indireta a abundância de vírus neste sistema.

## Introdução

O conceito de Alça Microbiana foi proposto no final do século XX por Azam (1983). De acordo com este conceito as bactérias planctônicas oxidam o Carbono Orgânico Dissolvido (COD) em gás carbônico ( $\text{CO}_2$ ) através da respiração, ou convertem o COD em biomassa bacteriana, tornando-se uma importante fonte de carbono para os níveis tróficos superiores quando são predadas. Recentemente, os vírus foram incluídos neste conceito e assumiram um papel fundamental no contexto da alça microbiana abastecendo o estoque de COD através da lise celular planctônica (BRATBAK e HELDAL, 2000, FUHRMAN, 1999).

Muitos estudos têm demonstrado que os vírus são os componentes mais abundantes e dinâmicos nos ambientes marinhos e de água doce (BETTAREL, et al., 2006, MARANGER e BIRD, 1995, MARANGER, et al., 1994, WOMMACK e COLWELL, 2000). A infecção viral na célula bacteriana e subsequente lise da célula exercem um papel significativo na mortalidade de bactérias (FUHRMAN, 1999, WILHELM e SUTTLE, 1999). Através do controle sobre a comunidade bacteriana, os vírus podem influenciar muitos processos ecológicos e biogeoquímicos, incluindo a ciclagem de nutrientes, a biodiversidade de algas e bactérias, a distribuição de espécie, o controle de florações algais, a formação de dimetil sulfato e a transferência genética (FUHRMAN, 1999, SUTTLE, 2005). Estudos baseados na taxa de decaimento dos vírus e em análises de microscopia eletrônica mostraram que os vírus são responsáveis pela morte de até 50% da comunidade bacteriana e entre 2 a 10% da mortalidade do fitoplâncton em ecossistemas aquáticos (BRATBAK e

HELDAL, 2000, FUHRMAN e NOBLE, 1995, SUTTLE, 1994, WILHELM e SMITH, 2000, WILHELM e SUTTLE, 1999). Alguns trabalhos indicam que a lise viral causa danos à comunidade bacteriana similares àqueles causados pela predação do zooplâncton (FUHRMAN e NOBLE, 1995, PROCTOR e FUHRMAN, 1990). Outro importante papel ecológico do vírus é o controle estrutural das comunidades. Por serem predadores específicos, eles controlam a abundância e a competitividade da espécie dominante (MARANGER e BIRD, 1995). Os vírus exercem influência na diversidade de espécie, ao contrário dos outros mecanismos de controle como a predação do zooplâncton e a limitação por nutrientes, que afetam a população bacteriana como um todo (BRATBAK G, et al., 1993).

Uma grande variedade de mecanismos, como a luz a temperatura e a limitação por nutrientes tem sido descrita como controladores da densidade viral, afetando a inativação e/ou a redução das infecções. A queda na abundância dos vírus em ecossistemas aquáticos é causada primariamente pela radiação solar, principalmente a radiação ultravioleta - UVB (NOBLE e FUHRMAN, 1997, WOMMACK, et al., 1996). Por possuírem apenas uma fina camada protéica envolvendo o material genético e não possuírem pigmentação eles são vulneráveis aos danos causados pela radiação solar.

Muitos trabalhos sobre a ecologia de vírus em ecossistemas aquáticos vêm sendo realizados em regiões temperadas e alguns trabalhos em zonas polares (KEPNER, et al., 1998, MADAN, et al., 2005, MARANGER, et al., 1994, STEWARD, et al., 1996, YAGER, et al., 2001). Até o momento, no entanto, um número muito reduzido de estudos tem focado a ecologia de vírus em

ecossistemas tropicais (BETTAREL, et al., 2006, PEDUZZI e SCHIEMER, 2004). Ressalta-se que, até o presente não há trabalhos com enfoque ecológico sobre o virioplâncton em águas brasileiras nem em águas da bacia amazônica, a maior bacia hidrográfica do mundo.

A principal força estrutural e a principal fonte de energia para os ecossistemas aquáticos amazônicos é o pulso de inundação, o qual é baseado em períodos de cheia e seca. Em períodos de águas altas, a conexão entre os ecossistemas aquáticos e terrestres aumenta e o Carbono Orgânico Dissolvido (COD) nos ecossistemas aquáticos passa a ser principalmente de origem alóctone. Por outro lado, durante o período de seca, a influência da floresta tropical nesses sistemas diminui e aumenta a importância do carbono de origem autóctone.

O Lago Batata é mais um lago a sofrer influência do pulso de inundação na Amazônia, entretanto ele difere dos demais lagos de inundação da Amazônia por ter sofrido, em parte de sua área, um aumento de turbidez devido ao lançamento de rejeito oriundo do beneficiamento do minério de bauxita entre os anos de 1979 e 1989. Muitos trabalhos demonstraram que a produção fitoplanctônica (ROLAND, et al., 2002); a atenuação da luz PAR (ROLAND e ESTEVES, 1998); a densidade, o crescimento e a produção bacteriana (ANESIO, et al., 1997); as populações de cladóceros (BOZELLI, 1996); o crescimento e desenvolvimento de *Oriza glumaepatula* (ENRICH-PRAST, et al., 2006); larvas de Chironomidae (LEAL, et al., 2004), além de outros parâmetros limnológicos são afetados pelo aumento da turbidez causada pelo lançamento de rejeito de bauxita no lago Batata.



## **Objetivo**

Este trabalho teve o objetivo de identificar a dinâmica das interações entre vírus e bactérias em relação ao pulso hidrológico em um lago amazônico onde o número de vírus pode estar sendo controlado pelo aumento de turbidez oriundo do lançamento de rejeito de bauxita e pelo regime hidrológico.

## **Hipóteses**

- a)** A estação impactada por rejeito de bauxita, por apresentar maior quantidade de matéria em suspensão, apresenta maior substrato para colonização das bactérias, o que suporta a maior quantidade de vírus quando comparada à estação natural.
  
- b)** O regime hidrológico governa a abundância de vírus e bactérias. No período de águas altas a abundância destas comunidades é menor comparada à observada no período de águas baixas.

## Área de Estudo

O Lago Batata ( $1^{\circ} 30'N$  e  $56^{\circ}20'W$ ) é um típico lago de inundação da Amazônia, localizado na margem direita do rio Trombetas, próximo a Porto Trombetas, no município de Oriximiná, no estado do Pará, Brasil (Figura 1). Este lago, assim como o rio Trombetas, é classificado como um ecossistema de águas claras, de acordo com a tipologia proposta por Harold Sioli (SIOLI, 1984). Águas como estas são caracterizadas por apresentarem pouca quantidade de nutrientes e pouca matéria em suspensão.

Os rios e lagos da Amazônia estão sujeitos a mudanças sazonais no nível da água (JUNK, et al., 1989). Nos períodos de águas altas aumenta a conexão entre os sistemas aquáticos e terrestres, por outro lado, nos períodos de águas baixas esta conexão fica reduzida. O Lago Batata difere dos demais lagos de inundação do rio Trombetas por ter sofrido, em parte de sua área, um aumento de turbidez devido ao lançamento de rejeito oriundo do beneficiamento do minério de bauxita entre os anos de 1979 e 1989. A bauxita é processada com jatos de água produzindo um efluente líquido (rejeito), composto de 7 a 9% de partículas sólidas de grãos finos (96% são menores do que  $50 \mu m$ ), representada principalmente por óxidos de alumínio, silicatos e óxidos de ferro (LAPA, 2000). Originalmente, o rejeito ocupava cerca de 30% da área do lago. Devido às constantes resuspensões, oriundas da flutuação do nível do lago, o rejeito se espalhou para uma área maior do que a inicial (ROLAND e ESTEVES, 1993). A grande série de dados aliada ao alto nível de conhecimento sobre esse sistema amazônico foi um diferencial para a condução dos estudos sobre a ecologia dos vírus neste lago.

## **Métodos**

### **Amostragem e preservação**

Amostras para a quantificação de vírus e bactérias à microscopia de luz foram coletadas na sub-superfície de duas estações do Lago Batata (estação natural e estação impactada) em quatro períodos entre os anos de 2005 e 2006. Os períodos de coleta foram representativos das fases do pulso de inundação: enchente, águas altas, vazante e águas baixas. Amostras para vírus e bactérias foram imediatamente fixadas com glutaraldeído (2% concentração final – pré filtrado em membrana de 0,02  $\mu\text{m}$  de porosidade). Amostras para análises limnológicas foram coletas utilizando-se garrafa tipo Van-Dor com capacidade para 3 litros. Amostras de água para análises de nutrientes foram imediatamente preservadas com ácido sulfúrico ( $\text{pH} < 2$ ) até o momento de serem processadas. Amostras para quantificação de clorofila *a* (100 mL) foram filtradas em filtros GF/C e analisadas através da extração com acetona 90% e leitura em fluorímetro. A turbidez foi analisada através de um turbidímetro (La-Motte 2010). O oxigênio dissolvido foi quantificado através do método de Winkler modificado por Roland (ROLAND, et al., 1999). A transparência da água foi verificada através da leitura de extinção do disco de Secchi.

### **Quantificação da abundância de vírus e bactéria**

Bactérias e vírus foram quantificados em microscópio de epifluorescência e corados com SYBR Green (10.000 vezes diluição inicial;

Molecular Probe, Eugene, OR, USA) de acordo com o método proposto por Noble (NOBLE e FUHRMAN, 1998). Antes da marcação, amostras de dois mL foram filtradas em membranas de 25 mm de diâmetro Anodisc, (0.02  $\mu\text{m}$ , de porosidade), com suporte de uma membrana de 0.45  $\mu\text{m}$  anterior ao filtro. Uma gota da solução de SYBR Green I (1:400), preparada com água destilada e filtrada em membrana de 0,02  $\mu\text{m}$ , foi colocada em placa de petri. Sobre esta gota foi colocado o filtro a fim de realizar a marcação dos espécimes. O material ficou em repouso por 15 minutos na ausência de luz. Após esse tempo, as lâminas foram montadas colocando uma gota da solução antifúngica, preparada no dia, para preservar a fluorescência da amostra, de acordo com (PATEL, et al., 2007). Seguiram-se as análises utilizando um microscópio invertido de epifluorescência Provis AX-70, Olympus microscopy (Olympus, Melville, NY, USA). Para cada filtro foram contados 20 campos aleatórios.

### **Preparação de amostras para Microscopia Eletrônica**

Amostras para microscopia eletrônica de transmissão (MET) foram coletadas e filtradas em rede de 30  $\mu\text{m}$  de poro, para remover as partículas maiores em suspensão, que dificultam as análises. Em laboratório, fez-se a centrifugação das amostras em 10.000 RPM por 10 minutos. Após a centrifugação, as amostras foram imediatamente fixadas em mistura recém preparada de aldeídos (1% de paraformaldeído e 1% de glutaraldeído em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4) por 1 hora, à temperatura ambiente. Após o período de fixação, as amostras foram lavadas em tampão fosfato (2,0 Molar,

pH 7,3) por duas vezes, e estocadas à temperatura de 4<sup>0</sup> C. Em seguida, as amostras foram incluídas em solução derretida de ágar a 2% em tampão cacodilato conforme procedimento anterior para manipulação de suspensões celulares para microscopia eletrônica. A inclusão em ágar permite o processamento das amostras sem contato direto com as células, o que poderia induzir alterações morfológicas e permite a obtenção de cortes contendo número expressivo de células para análise. Pellets de ágar contendo as suspensões foram, posteriormente, mantidos a 4<sup>0</sup> C em tampão para posterior processamento para MET.

### **Microscopia Eletrônica de Transmissão**

Os pellets de ágar contendo os espécimes foram processados de acordo com o método descrito por Melo, *et al.*, 2005. As amostras foram rapidamente fixadas com tetróxido de ósmio em tampão “Sym Collidine”, pH 7,4, por 2 horas à temperatura ambiente. Após a lavagem com tampão de maleato de sódio, pH 5,2, as amostras foram contrastadas *in bloc* com acetato de uranila 2% em tampão maleato de sódio (0,05 M, pH 6,0) por 2 horas em temperatura ambiente e lavados com a mesma solução tampão. Após a lavagem as amostras foram desidratadas em gradiente de etanol, infiltradas e incluídas em meio de inclusão (Eponate 12 Resin; Ted Pella, Redding, CA, USA). Após a polimerização a 60<sup>0</sup> C por 16 horas, as seções foram cortadas utilizando navalha de diamante em ultra-micrótomo LKB (LKB instrumentos, Gaithersburg, MD, USA). As seções foram montadas em telas de cobre de 200-

mesh (Ted Pella) e contrastadas com citrato de chumbo. As amostras foram examinadas em microscópio eletrônico de transmissão (P300, Philips, Eindhoven, The Netherlands) a 60 KV.

Para o estudo da morfologia bacteriana e interação vírus-bactéria, as amostras foram observadas ao MET em aumentos de 18.000 e 40.000 vezes. Trinta e cinco micrografias eletrônicas foram obtidas aleatoriamente e analisadas em aumento final de 36.000 a 80.000 vezes. Os vírus foram caracterizados baseados na estrutura, tamanho, eletro-densidade e uniformidade estrutural (WEINBAUER e HOFLE, 1998). As células foram consideradas infectadas quando, no mínimo, três fagos foram observados em cada célula (WEINBAUER e HOFLE, 1998).

### **Análise estatística**

As correlações entre vírus, bactérias, razão vírus/bactéria e turbidez foram feitas através da correlação de Spearman. O teste ANOVA unifatorial foi utilizado para se obter diferença entre as estações amostras e entre os períodos do pulso de inundação. Foi aplicado teste Anova 'two-way', para verificar a diferença entre os dados espaciais e temporais. Para todas as análises utilizou-se o software JMP 5.0.

## **Resultados**

Vinte e sete anos após o início do impacto ambiental no Lago Batata e depois de 20 anos de contínuo monitoramento de sua turbidez, o cenário real da estação impactada é claramente diferenciado em relação aos primeiros anos (Figura 02). A quantidade de material que é suspendida pela ação do pulso hidrológico é reduzida ano após ano, diminuindo a turbidez na estação impactada do lago Batata. Entretanto, apesar da redução da turbidez, a área impactada do Lago ainda apresenta elevada turbidez quando comparada a áreas naturais (Figura 02).

A estação natural durante o período de estudo foi caracterizada por apresentar reduzida quantidade de matéria em suspensão e turbidez e elevada densidade de vírus e bactérias em relação a estação impactada (tabela 1).

### **Abundância de Vírus e Bactérias**

Durante as flutuações anuais do nível rio Trombetas e conseqüentemente do Lago Batata, foi verificado um padrão inverso em relação à abundância de vírus e bactérias e a altura da coluna d'água. Durante o período de águas altas, foram encontradas as menores abundâncias de vírus e bactérias, enquanto que os maiores abundâncias ocorreram durante o período de águas baixas. Nos períodos de enchente e vazante, as abundâncias foram intermediárias àquelas encontradas nos períodos de águas altas e águas baixas (Figura 03).

Na estação natural, sem influência do rejeito de bauxita, a VLP variou entre 0,41 e 0,22 VLP x 10<sup>-7</sup>. A VLP nesta estação foi semelhante nos períodos de enchente e águas altas, enquanto que nos períodos de vazante e águas baixas o número de vírus foi estatisticamente diferente dos outros dois períodos (teste t; p < 0.05). A densidade bacteriana nesta estação oscilou entre 0,72 e 4,17 células x 10<sup>-6</sup>, sendo que o período de águas baixas foi diferenciado em relação aos outros períodos (Figura 3). A enchente foi semelhante aos períodos de vazante e águas altas (teste t; p<0.05).

O número de vírus (VLP) presente no lago Batata superou em cerca de uma ordem de grandeza o número de bactérias em suspensão na coluna d'água (Figura 04-(A)). Foi encontrada uma forte correlação entre a densidade viral (VLP) e a densidade bacteriana no lago Batata (p < 0.05; r<sup>2</sup> = 0.75; n = 53), em todos os períodos do pulso de inundação (Figura 04-(B)). Foi verificada uma diferença significativa entre as estações natural e impactada do lago Batata, em relação ao número de vírus (VLP) e a densidade bacteriana (ANOVA; p = 0.06; n = 26). Na estação impactada o número de vírus (VLP) variou entre 0,21 e 1,70 VLP x 10<sup>-7</sup>. Nesta estação, em relação aos períodos do pulso hidrológico, o período de enchente e águas altas foram estatisticamente semelhantes, enquanto os períodos de vazante e águas baixas foram diferentes entre si e entre os outros dois períodos (p < 0.05). Nessa mesma estação, a densidade bacteriana oscilou entre 0,35 e 5,28 céls.x 10<sup>-6</sup>. O período de águas baixas foi estatisticamente diferenciado dos outros períodos do pulso hidrológico em relação à abundância bacteriana (p < 0.05).



O período de Vazante foi o único período diferenciado em relação à razão vírus/bactérias ( $p < 0.05$ ). A VBR variou entre 7,05 e 3,22 no Lago Batata durante o ano amostrado, sendo a média e o desvio padrão igual a 5,01 e 1,00, respectivamente (Figura 5). Não foi verificada nenhuma diferença entre as estações natural e impactada em relação a razão vírus e bactéria.

### **Análises à Microscopia Eletrônica de Transmissão**

A análise em MET revelou grande diversidade de bactérias nas águas do Lago Batata (Fig 06). Estruturas bacterianas foram claramente visualizadas, incluindo a região citoplasmática, nucleóide, espaço periplasmático, cápsulas, e membrana celular com clássico aspecto trilaminar (Figura 6). A microscopia eletrônica possibilitou não apenas a identificação das bactérias, mas também a diferenciação entre células bacterianas não infectadas (Figura 6 (A e B)) e infectadas (Fig 06 (C)). Um número variável de fagos estavam presentes no interior das bactérias, sendo observado um número médio de 10 fagos por seção celular. A estrutura da cápsula viral com típica unidade morfológica pôde ser observada detalhadamente em grande aumento (Fig 06 (C)). As bactérias infectadas apresentaram membrana celular intacta, ou mostraram alterações morfológicas da membrana celular ou do citoplasma (citoplasma vazio ou parcialmente deteriorado), indicando a ocorrência de rompimento e/ou degeneração bacterianas. A análise quantitativa em MET demonstrou que 20% das bactérias estavam infectadas com, em média, 10 fagos por seção celular.

## Discussão

A turbidez no lago Batata vem sendo monitorada desde 1989. Portanto, existe uma série temporal considerável para esta variável limnológica, que é a principal indicadora do impacto causado pela deposição de rejeito oriundo da lavagem do minério de bauxita. O monitoramento ajudou a compreender o comportamento do rejeito ao longo dos anos. Correntes de ventos juntamente com o pulso de inundação ressuspendem o rejeito do sedimento para a coluna d'água e com isso aumentam a turbidez na área impactada. Por outro lado, o baixo nível da água expõe o rejeito à radiação solar nos períodos de seca e ajuda a solidificá-lo. Logo, a quantidade de partículas em suspensão a cada ano, é uma integração da quantidade de partículas que são ressuspensas e a quantidade das partículas que são solidificadas. Como já se passaram 30 anos desde o início do lançamento do rejeito, este vem sendo constantemente solidificado pela radiação solar, o que contribuiu para a diminuição da turbidez na área impactada. Com isso, a interferência da turbidez em vários parâmetros e processos limnológicos como a produção primária, a biomassa e a produtividade do bacterioplâncton entre outros, possivelmente esteja sendo reduzida.

A variação do nível hidrológico exerce um controle importante sobre as abundâncias bacteriana e viral, influenciando na densidade, e na produção de bactérias (FARJALLA, et al., 2006) e na densidade de vírus. Durante o período de águas altas, ocorre a diluição e conseqüentemente a diminuição da densidade de vírus e bactérias. Por outro lado, nos períodos de águas baixas, as comunidades são concentradas na coluna d'água.

O presente trabalho mostrou que a abundância bacteriana e viral na estação impactada foi menor do que aquela encontrada na estação natural, durante os períodos de vazante e águas baixas. Três fatores parecem contribuir principalmente para a queda da densidade de bactérias na estação impactada: i) Anésio (ANESIO, et al., 1997) mostrou que a turbidez causada pelo rejeito de bauxita pode afetar a abundância bacteriana durante a estação seca no Lago Batata. Na área impactada a quantidade de matéria em suspensão é maior, portanto as taxas de sedimentação são maiores. Isto pode explicar a queda da densidade viral (VLP) e da densidade bacteriana nesta área, durante os períodos onde o nível da água é baixo. ii) O rejeito de bauxita influencia na taxa de fotossíntese, uma vez que reduz a penetração de luz, e a produção primária (ROLAND, et al., 2002). Como o Carbono Orgânico Dissolvido (COD) no período de seca é basicamente de origem autóctone, com a redução da produção primária, fica reduzida a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido para as bactérias. iii) Outro controlador das bactérias livres na estação impactada é a alta biomassa de zooplâncton (BOZELLI, 1994) nesta estação, que pode exercer um controle descendente, através da predação, na comunidade bacteriana.

Muitos estudos têm indicado que, quando as abundâncias de vírus e bactérias são correlacionadas, a maioria dos vírus presentes no ambiente são bacteriófagos (COCHLAN, et al., 1993, KEPNER, et al., 1998, MARANGER e BIRD, 1995, PROCTOR e FUHRMAN, 1990, VOLLENWEIDER e KERKES, 1980). Os nossos dados suportam esta idéia, pois a abundância de vírus esteve fortemente correlacionada à abundância de bactérias nas estações do

Lago Batata, e não foi encontrada correlação entre VLP e a concentração de clorofila *a*. Por isso, é possível pensar que a diferença na VLP encontrada entre as estações do Lago Batata é resultado indireto da quantidade de partículas em suspensão e resultado direto da comunidade bacteriana. A simples sedimentação do rejeito em suspensão não poderia influenciar diretamente no número de vírus, e a sedimentação de partículas virais ocorreria de maneira indireta através da sedimentação de bactérias aderidas. Fisher et al., 2004, demonstraram que a sedimentação de vírus em suspensão não contribui significativamente para a comunidade viral no sedimento. O aumento da turbidez na área impactada diminui a abundância de bactérias e conseqüentemente de vírus, por outro lado, na área natural, onde a turbidez é menor, há um aumento da abundância de bactérias e com isso há também o aumento no número de vírus em relação à área impactada.

A VBR é uma medida da relação entre a população de vírus e de bactérias, e fornece uma indicação da multiplicidade de infecção (MOI), com o número médio de fagos por bactérias. Baixas MOI significam menor quantidade de fagos por bactérias e o inverso também é verdadeiro, alta MOI sugere grande quantidade de fagos por bactérias (LENSKI, 1988). Valores elevados de VBR podem indicar a alta taxa de produção viral ou pequeno decaimento do número de vírus ou que existe uma alta taxa de MOI onde mais de um vírus ataca a mesma célula hospedeira (LENSKI, 1988). Na maioria dos sistemas, a VBR é maior do que 1, variando entre 5 e 83 em amostras de ambientes marinhos (WEINBAUER, et al., 1993), e entre 5 e 20 em ambientes de água doce (MATHIAS, et al., 1995). Baixos valores de VBR, como os que foram

encontrados no Lago Batata, podem indicar baixas taxas de infecção, um número pequeno de partículas virais para cada célula hospedeira bacteriana ou alta taxa de decaimento do número de vírus. No Lago Batata, a VBR esteve praticamente constante em relação aos períodos do pulso de inundação, apenas o período de vazante foi diferenciado dos demais. Como a maioria dos vírus presente no Lago Batata são bacteriófagos, é suposto pensar que qualquer interferência na comunidade bacteriana é refletida na mesma proporção na abundância de vírus. Isto faz com que apesar da grande flutuação anual do nível do rio e apesar da diferença entre as estações, a razão entre vírus e bactéria se mantém estável durante o ano todo e semelhante entre as estações lago.

A densidade de vírus (VLP) em águas naturais depende da produção e liberação de novas partículas virais e do decaimento do número de partículas virais livres (BRATBAK G, et al., 1993). Se a taxa de decaimento dos vírus for baixa, a VLP pode aumentar. Por outro lado, se a infecção viral for menor do que a taxa de decaimento, então a VLP tende a diminuir. Portanto, a diminuição da densidade viral é resultado do decaimento do número de vírus livres e da taxa de infecção viral. A taxa de infecção viral em sistemas aquáticos é primariamente afetada pela radiação solar (NOBLE e FUHRMAN, 1997, WILHELM, et al., 1998, WOMMACK, et al., 1996). Portanto a VLP em ecossistemas aquáticos tropicais poderia ser menor do que em ecossistemas aquáticos temperados, porque em zonas tropicais existe maior incidência de irradiação solar. Devido ao número restrito de trabalhos sobre vírus em ecossistemas aquáticos tropicais, até o presente momento registra-se um

estudo no oeste da África (BETTAREL, et al., 2006) e outro em um reservatório do Sri Lanka (PEDUZZI e SCHIEMER, 2004), torna-se difícil a comparação de dados com o presente estudo. No entanto, pode-se especular sobre a menor abundância de vírus em ecossistemas aquáticos tropicais em relação aos ecossistemas temperados. Bettarel (BETTAREL, et al., 2006) faz questionamento importante em seu artigo: São os vírus tropicais pouco adaptados a altos níveis de radiação Ultra Violeta? O presente trabalho não possui a resposta para esta questão, mas suporta a idéia e pode contribuir na construção de uma resposta, uma vez que o número de vírus livres e a quantidade de fagos infectando bactérias são reduzidos em relação àqueles encontrados em ambientes aquáticos temperados ( $VLP \times 10^{10}$  em ambientes temperados, enquanto que o presente trabalho atingiu  $VLP \times 10^7$ ).

A análise ultra-estrutural de bactérias por MET mostrou que a comunidade bacteriana estudada na região amazônica apresenta grande diversidade morfológica. Uma vez que a maioria dos vírus são bacteriófagos e predadores específicos, é esperado que também haja grande diversidade viral nos ecossistemas aquáticos amazônicos.

A técnica de MET utilizada no presente trabalho facilitou a visualização de estruturas bacterianas típicas e permitiu a observação clara de bactérias infectadas, uma vez que as bactérias e vírus são observados em cortes de 80 nm de espessura, com visualização nítida do citoplasma bacteriano. Tal fato não ocorre, por exemplo, com a utilização da técnica de coloração negativa para MET, quando se analisa a bactéria sem microtomia (o organismo é observado inteiro) e, portanto, não é possível a observação de detalhes do

citoplasma e individualização clara de vírus. A técnica utilizada mostrou-se, portanto, excelente ferramenta técnica para se estudar as interações entre vírus e bactérias em ecossistemas aquáticos.

A infecção de vinte por cento das bactérias no Lago Batata representa a redução, na mesma proporção, do processamento da matéria orgânica pela comunidade bacteriana no lago. Por outro lado, a matéria orgânica liberada pela ruptura da célula hospedeira é mais fácil de ser utilizada por outras bactérias (AMON e BENNER, 1996), o que favorece o crescimento bacteriano.

Em conclusão, os dados do presente trabalho evidenciam de maneira relevante, o papel dos vírus na regulação das bactérias também em ecossistemas aquáticos amazônicos. Eles mostram ainda que a turbidez causada pelo lançamento do rejeito de bauxita no Lago Batata influencia de maneira indireta a abundância de vírus neste sistema.

Tabela 1: Caracterização das estações amostradas no Lago Batata.

	Estação Natural	Estação Impactada
Matéria em suspensão (mg L <sup>-1</sup> )	1,81 ± 0,54	6,73 ± 5,69
Turbidez (NTU)	12,70 ± 4,48	24,70 ± 12,69
Nitrogênio Total (mg L <sup>-1</sup> )	0,41 ± 0,04	0,41 ± 0,02
Fósforo Total (µg L <sup>-1</sup> )	15,96 ± 4,88	16,96 ± 10,77
Oxigênio Dissolvido (mg L <sup>-1</sup> )	6,68 ± 0,26	6,64 ± 0,88
Alcalinidade (µE L <sup>-1</sup> )	35,10 ± 15,24	33,01 ± 24,20
Vírus (VLP x 10 <sup>7</sup> mL <sup>-1</sup> )	1,10 ± 0,54	0,81 ± 0,45
Bactéria (cells x 10 <sup>6</sup> mL <sup>-1</sup> )	2,27 ± 1,19	1,70 ± 1,13
Razão vírus/bactéria (VBR)	4,96 ± 1,04	5,06 ± 0,97
Clorofila a (µg L <sup>-1</sup> )	5,25 ± 0,93	3,89 ± 1,87
Fitoplâncton (ind L <sup>-1</sup> )	1239 ± 3029	1139 ± 2752
Zooplâncton (ind x 10 <sup>3</sup> L <sup>-1</sup> )	45,95 ± 15,46	75,17 ± 19,41



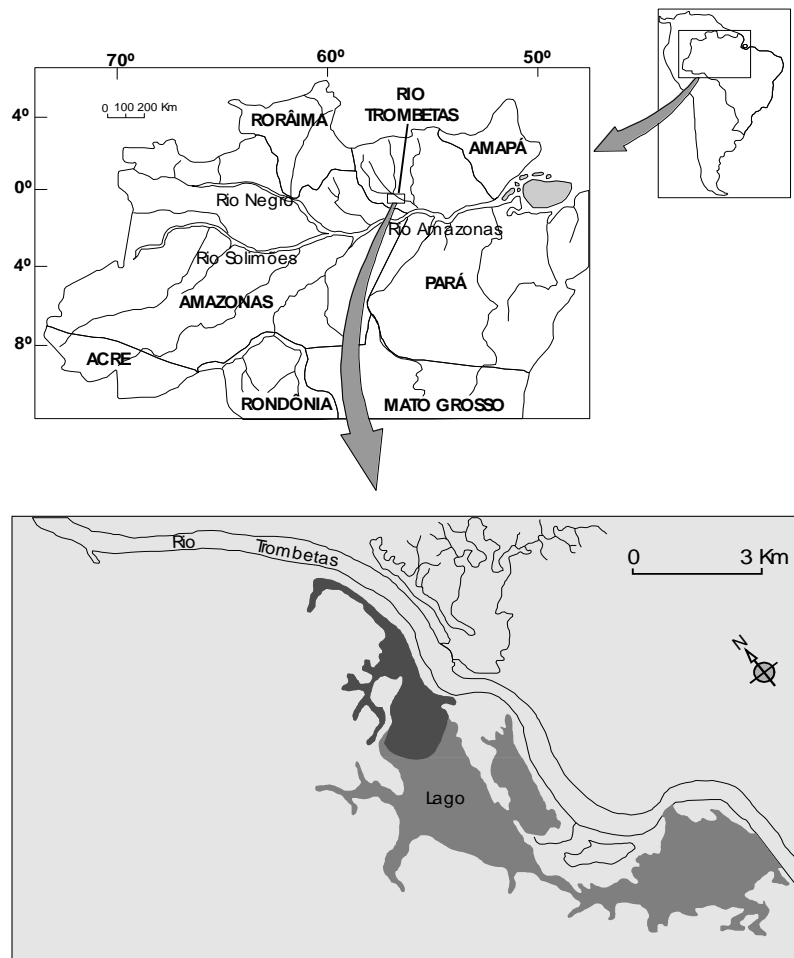


Figura 1: Localização da região amostrada. O Lago Batata é um lago de inundação do Rio Trobetas, próximo ao distrito de Porto Trombetas, município de Oriximiná, estado do Pará, Brasil. Pode-se distinguir duas áreas diferentes dentro do lago: i) impactada por rejeito de bauxita (cinza escuro); ii) sem influência do rejeito (cinza claro).

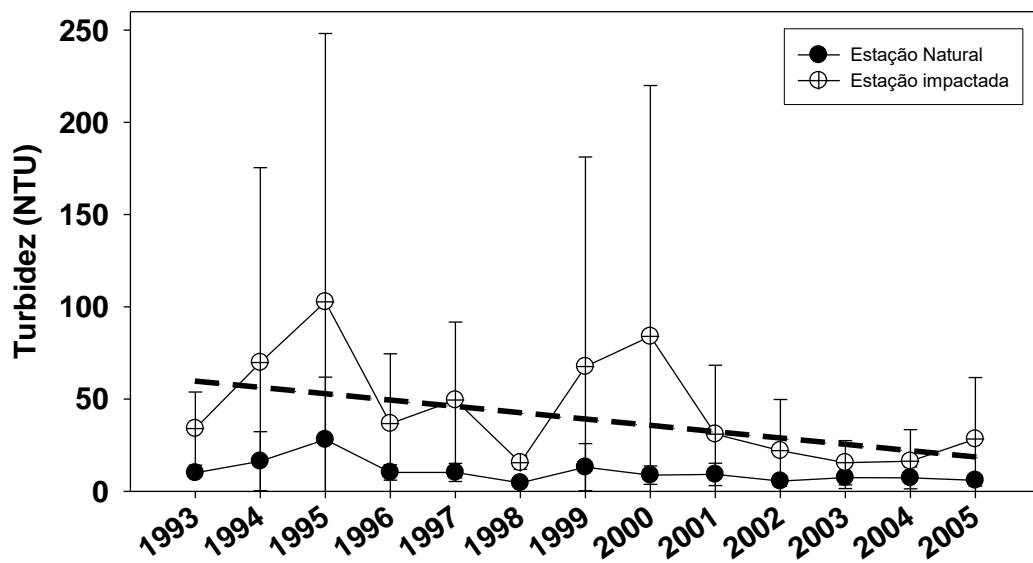


Figura 4 – Série temporal de turbidez medida no Lago Batata na estação natural (pontos pretos) e na estação impactada (pontos brancos). Note o real decaimento da turbidez na estação impactada ao longo dos anos, o que pode diminuir a influência deste parâmetro nas comunidades presentes nesta estação.

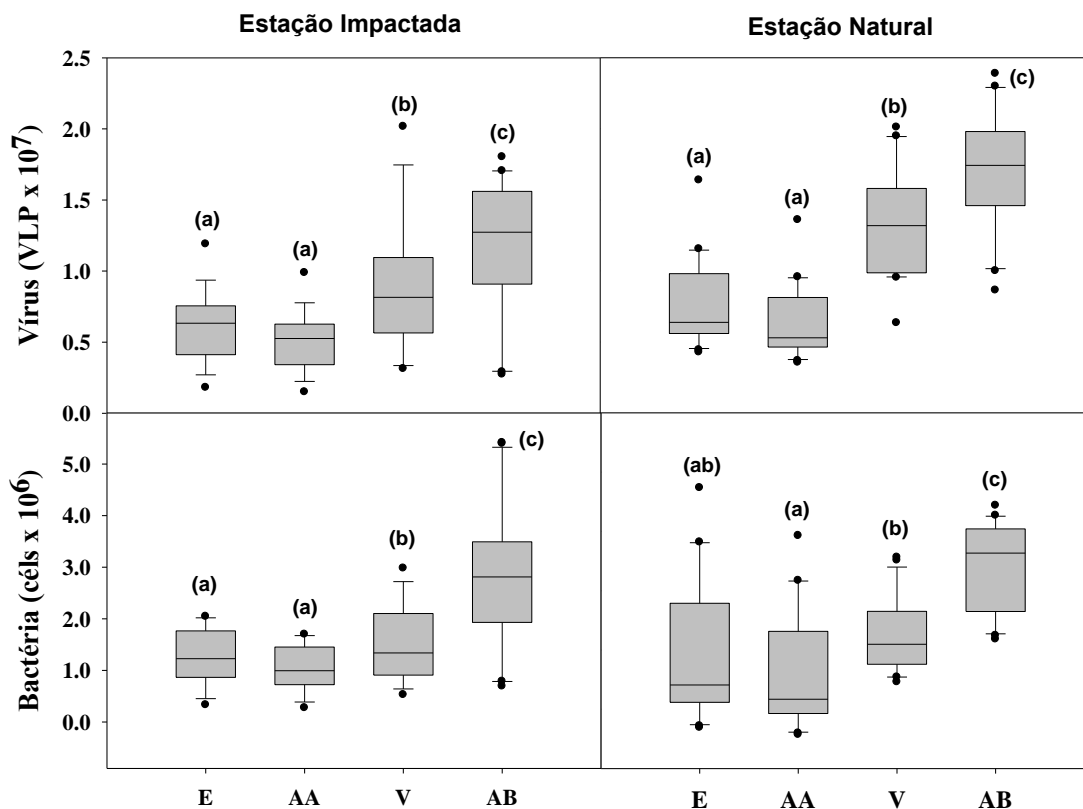


Figura 3 – Abundância de Vírus e Bactérias nas estações amostradas durante os quatro períodos do pulso de inundação: E – Enchente; AA – Águas altas; V – Vazante e AB – Águas Baixas. As letras entre parêntese mostram os resultados do teste de médias, os períodos não representados pela mesma letra são significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ;  $n = 18$ ). As linhas das caixas representam a mediana, as caixas, os traços e representam respectivamente 75 e 95% dos dados, os pontos são dados discrepantes.

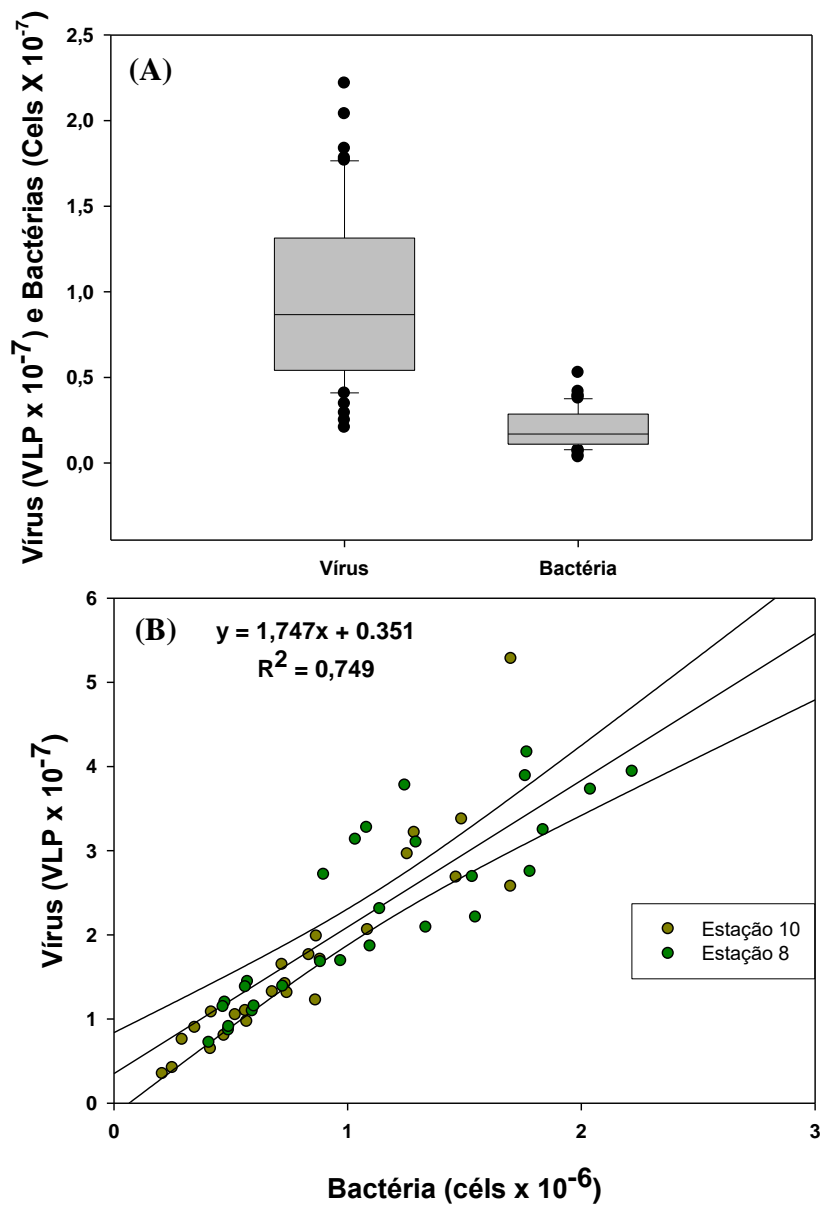


Figura 4 – Variação do número de vírus e bactérias (A) no Lago Batata. A abundância de vírus superou em cerca de uma ordem de grandeza a abundância bacteriana. Em (B), observa-se a forte correlação entre vírus e bactérias no Lago Batata.

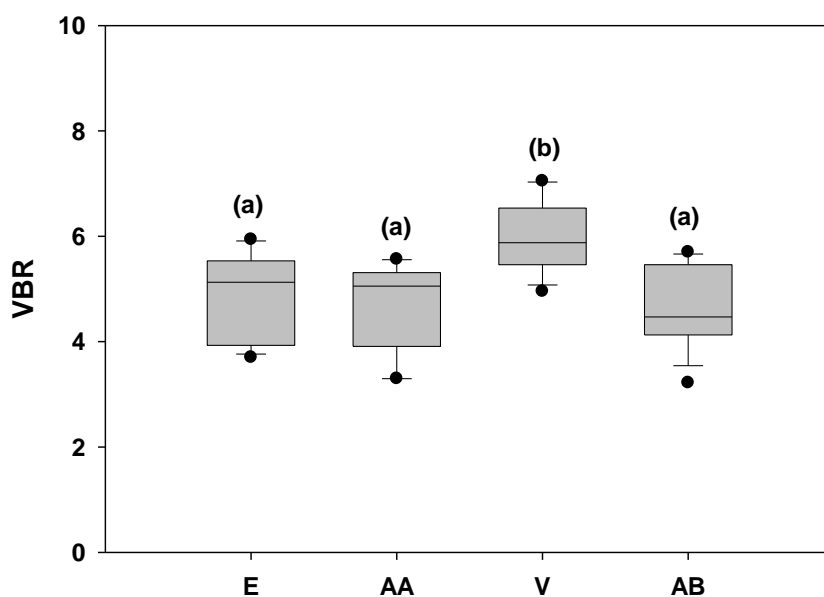


Figura 5 – Variação da razão vírus/bactérias (VBR) no Lago Batata durante os períodos de Enchente (E); Águas Altas (AA); Vazante (V) e Águas Baixas (AB). As letras entre parêntese no interior do gráfico mostram os resultados do teste de médias, o período de vazante é significativamente diferente dos outros períodos ( $p < 0.05$ ). As linhas das caixas representam a mediana, as caixas, os traços e representam respectivamente 75 e 95% dos dados, os pontos são outliers.

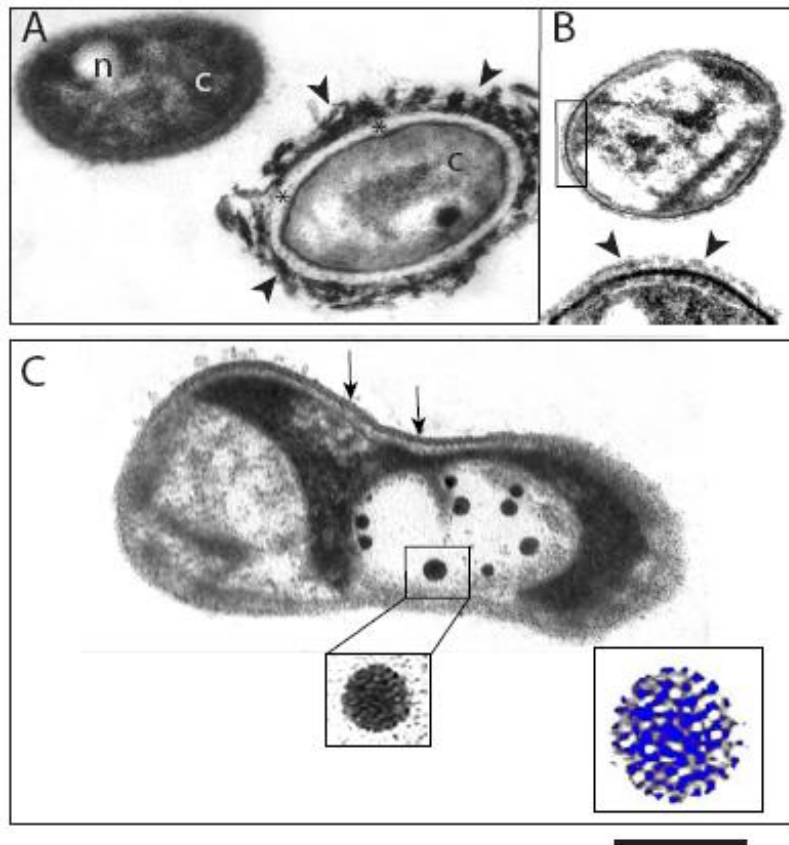


FIGURA 6 – Micrografia Eletrônica, obtida em microscópio eletrônico de transmissão, de bactérias de um ecossistema aquático amazônico (Lago Batata). A e B mostram bactérias não infectadas. Estruturas bacterianas como o citoplasma (c), o nucleóide (n), o espaço periplasmático (\*) e a cápsula externa (setas) foram claramente observadas. Em A, dois tipos distintos de bactérias são mostrados no mesmo campo. Note a espessura variável da cápsula bacteriana (pontas de setas), alta e densa em A comparada com B. A área do retângulo marcado em B está ampliada na parte de baixo da mesma figura. Note que a célula apresenta parede celular muito eletrônica-densa abaixo da cápsula. C é uma bactéria infectada com muitos fagos. Um desses vírus é mostrado em grande aumento (quadrado). Note que o capsídio é composto de repetitivas unidades morfológicas (em destaque em azul, grande aumento). A membrana celular, com típica estrutura trilaminar, é parcialmente observada (seta). Escala: barra, 460 nm (A, B); 300 nm (B, alta ampliação); 266 nm (C); 80 nm (C, vírus em alta ampliação); 40 nm (C, vírus em alta ampliação, destacado em azul).

## Capítulo 2

### Vírus em Lagos Amazônicos de águas claras: Fatores controladores

Nathan O. Barros<sup>1</sup>

Rossana C. N. Melo<sup>2</sup>

Fábio Roland<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Ecologia Aquática e <sup>2</sup>Laboratório de Biologia Celular, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, UFJF, Juiz de Fora, MG, Brasil;

\*Endereço de Correspondência: Universidade Federal de Juiz de Fora, Departamento de Biologia, Campus, 36036-900, Juiz de Fora, MG, Brasil.

Telefone: +55 32 3229 3206 ext. 223

Fax: +55 32 3229 3226

## Resumo

Desde que foram incorporados no modelo da alça microbiana, os vírus assumiram um papel singular em muitos processos biogeoquímicos, entre eles o controle de espécies e a ciclagem de nutrientes. Muitos fatores influenciam na abundância viral, como: a incidência de radiação solar, a disponibilidade de carbono orgânico dissolvido e a abundância bacteriana. Nós verificamos a abundância e a dinâmica dos vírus em ecossistemas aquáticos amazônicos de águas claras através da microscopia de epifluorescência. Apesar da variação entre o número de vírus e bactérias entre os lagos estudados, a razão entre estas duas comunidades (VBR) permaneceu constante. A VBR foi maior em lagos com menor disponibilidade de carbono, sugerindo que em lagos húmicos a taxa de infecção viral é menor. A abundância de vírus foi relacionada à disponibilidade de fósforo, a profundidade do lago, a entrada de luz na água e a abundância bacteriana. Não foi encontrada relação direta entre a abundância de vírus e o carbono orgânico dissolvido. Nossos dados mostram que também nos lagos amazônicos de águas claras a maioria dos vírus presentes são bacteriófagos e que o pulso de inundação, e a comunidade bacteriana controlam a abundância viral nestes sistemas.



## Introdução

A cadeia microbiana em ecossistemas aquáticos, duas décadas atrás, era dita como completa. As bactérias eram os organismos mais dinâmicos e abundantes nos sistemas aquáticos e exerciam uma função singular em muitos processos ecológicos, entre eles a ciclagem de nutrientes. O interesse pelo papel ecológico dos vírus surgiu quando Bergh (BERGH, et al., 1989) mostrou que eles excedem as bactérias em cerca de uma ordem de grandeza. Outros estudos (FUHRMAN, 1999, PROCTOR e FUHRMAN, 1990, SUTTLE, et al., 1990, WILHELM e SUTTLE, 1999) também mostraram que os vírus são os componentes mais abundantes e dinâmicos do ecossistema aquático, que possuem um papel fundamental na cadeia microbiana e que são agentes significantes no controle de microorganismos aquáticos.

Uma grande variedade de mecanismos tem sido descritos como controladores da densidade viral, afetando a inativação e/ou a redução das infecções. A radiação solar (NOBLE e FUHRMAN, 1997, WOMMACK, et al., 1996) e nutrientes (fósforo, nitrogênio e o carbono) (ANESIO, et al., 2004, VREDE, et al., 2003) são responsáveis pela variação da abundância viral. Todos eles são ainda mais agravados na região amazônica onde, o pulso de inundação influencia fortemente na abundância das comunidades (BOZELLI, 1994).

Junk (JUNK, et al., 1989) propõe que o pulso de inundação de um rio é a principal força controladora da biota em sistemas rios-planície de inundação, resultando em respostas morfológicas, anatômicas, fisiológicas, fenológicas

e/ou etológicas produzindo comunidades características. A magnitude das flutuações do nível da água aliada à morfologia do hábitat, topografia, vegetação, fatores físicos e químicos da água e produtividade disponível para a cadeia trófica em diferentes setores são alguns dos componentes de um mosaico de condições associadas à diversidade de nichos. Metodologicamente, o pulso de inundação dos ecossistemas amazônicos é dividido nos períodos de enchente; águas altas; vazante e águas baixas.

Durante o período de águas altas a conectividade entre os ambientes terrestres e aquáticos é aumentada e o carbono de origem alóctone passa a ser a principal fonte de energia para o ambiente aquático. Por outro lado, durante o período de águas baixas a conectividade entre os ambientes terrestres e aquáticos é reduzida e a principal fonte de carbono passa a ser o carbono autóctone, ou seja, produzido no próprio ambiente principalmente pelo fitoplâncton (JUNK, 1989).

O rio Trombetas é um afluente da margem esquerda do rio Amazonas, e assim como os lagos de sua bacia, é um ecossistema amazônico de águas claras, de acordo com a tipologia proposta por Sioli (SIOLI, 1984). Assim como os rios e lagos amazônicos o rio Trombetas está sobre a influência do pulso de inundação (figura 1). O rio tem sua origem no planalto das Guianas, uma formação geológica da era pré-câmbriana. Sistemas que banham solos desgastados iguais a estes em geral possuem pouca quantidade de matéria em suspensão e são relativamente pobres em nutrientes. Suas águas encontram o rio Amazonas próximo a cidade de Oriximiná, no oeste do estado do Pará. No curso superior do rio Trombetas as chuvas influenciam a variação

do nível das águas, enquanto no curso inferior o nível é regulado pelo represamento causado pelo rio Amazonas (FERREIRA, E.J.G., 1993).

### **Objetivo**

O objetivo deste trabalho foi avaliar as interações entre vírus e bactérias e a dinâmica destas comunidades em lagos marginais ao rio Trombetas durante o período de águas baixas onde predomina o carbono de origem autóctone. Além disto, buscou-se avaliar a influência dos possíveis controladores da abundância viral nestes sistemas.

### **Hipótese**

- a) O número de vírus está correlacionado com a abundância bacteriana.
- b) Existe uma forte relação entre a abundância de vírus e a concentração de carbono orgânico dissolvido.
- c) A abundância viral é maior nos lagos mais a montante do encontro do rio Trombetas com o rio Amazonas, devido a diluição provocada subida da água nos lagos mais próximos ao Amazonas.

## **Área de Estudo**

A bacia de drenagem amazônica possui área aproximada de 7.050.000 km<sup>2</sup>, (SIOLI, 1984) e a média anual de precipitação dentre estes vastos limites varia entre 1500 e 3000 mm (LIN, 2003). Na maior parte da bacia amazônica esta alta pluviosidade é distribuída heterogeneamente ao longo do ano, havendo uma época relativamente seca (verão) e outra chuvosa (inverno) (FERREIRA, E. J. G., 1992). O ciclo anual de cheia e seca dos grandes rios é efeito desta sazonalidade, correspondendo a um único pulso de inundação cujo período varia dependendo da localização em relação ao rio Amazonas. Nos tributários da margem direita a enchente vai de setembro/outubro a abril/maio, enquanto nos da margem esquerda o pico da cheia ocorre em junho/julho.

Amostras para a quantificação de vírus e bactérias foram coletadas na sub-superfície de 26 lagos marginais, ao Rio Trombetas, sendo treze lagos em cada margem do rio (Figura 2). Eles se diferenciavam quanto a área, o perímetro e a distância em relação ao rio Amazonas (Tabela 1).

## **Métodos**

### **Amostragem e preservação**

Amostras de 2 mL para vírus e Bactérias foram imediatamente fixadas com glutaraldeído (2% concentração final – pré filtrado em membrana de 0,02 µm de porosidade). Em campo, mediu-se a concentração de oxigênio dissolvido, vento, pH, a profundidade do ponto de coleta e a transparência da água através da extinção do disco de Secchi. Amostras para turbidez, clorofila,

fósforo total, nitrogênio total foram retiradas em garrafas de plástico de 1 litro e levadas para o laboratório onde se seguiram as análises. A turbidez foi medida com o auxílio de um turbidímetro modelo Lamotte 2010. Amostras de clorofila a foram analisadas através da filtração em filtros GF/C (com réplicas) e os filtros foram estocados a temperatura abaixo de 4° C até serem processadas segundo acetona 90% como extrator. O nitrogênio e fósforo total foram quantificados por espectroscopia segundo Wetzel e Likens (1991).

### **Quantificação da abundância de vírus e bactérias**

Bactérias e vírus foram quantificados em microscópio de epifluorescência e corados com SYBR Green (10.000 vezes diluição inicial; Molecular Probe, Eugene, OR, USA) de acordo com o método proposto por Nobre (NOBLE e FUHRMAN, 1998). Anteriormente a marcação, amostras de dois mL foram filtradas em membranas de 25 mm de diâmetro Anodisc, 0,02 µm, de porosidade, com suporte de uma membrana de 0,45 µm anterior ao filtro. Uma gota da solução de SYBR Green I (1:400), preparado com água destilada, filtrada em membrana de 0,02 µm, foi colocada em placa de petri. Sobre esta gota foi colocado o filtro a fim de realizar a marcação dos espécimes, o material ficou em repouso por 15 minutos na ausência de luz. Após esse tempo montou-se as lâminas, colocando uma gota da solução de montagem, preparada no dia, para preservar a fluorescência da amostra (PATEL, et al., 2007). Seguiram-se as análises utilizando um microscópio invertido de epifluorescência Provis AX-70 Olympus microscopy (Olympus, Melville, NY, USA). Para cada filtro foram contados 20 campos escolhidos aleatoriamente.

## **Morfologia dos lagos**

Dados de área, perímetro e distância entre os lagos e o rio Amazonas foram estimados utilizando a imagem processada pelo software ArcGis. Os lagos foram separados entre aqueles situados abaixo e acima de 25 km (valor mediano das distâncias) medidos entre a entrada principal de cada lago e o encontro entre o rio Trombetas e o rio Amazonas.

## **Análise estatística**

Correlações entre vírus, bactérias, razão vírus/bactéria e turbidez foram feitas através da correlação de Spearman. ANOVA unifatorial foi utilizado para se obter diferença entre as estações amostras e entre os períodos do pulso de inundação. Foi aplicado o teste Tukey, para verificar a diferença entre as médias. Para todas as análises foi utilizado o software JMP 5.0.

## Resultado

Foi verificada uma diferença significativa entre lagos situados mais a montante do rio Trombetas (acima de 25 km) e os lagos situados mais próximos ao encontro deste rio com rio Amazonas, em relação ao número de vírus e bactérias (teste t;  $p < 0.05$ ) (Figura 03). Lagos localizado mais próximo ao rio Amazonas apresentaram menor abundâncias de vírus e bactérias. Não foi verificada diferença significativa entre lagos situado à margem direita e esquerda do rio Trombetas.

O número de vírus superou em cerca de uma ordem de grandeza a abundância bacteriana nos lagos amostrados, sendo a média e o desvio padrão igual a  $1,90 \pm 0,73$  (VLP  $\times 10^{-7}$ )  $4,49 \pm 1,97$  (Céls  $\times 10^{-6}$ ) (Figura 03 - A). A abundância viral esteve entre 0,44 (VLP  $\times 10^{-7}$  Lago Sapucuá), e 3,09 (VLP  $\times 10^{-7}$  Lago Palhau) enquanto que a abundância bacteriana oscilou entre 0,82 (Céls  $\times 10^{-6}$  Lago Sapucuá) à 8,32 (Céls  $\times 10^{-6}$  Lago Farias). A razão vírus bactérias (VBR) variou entre 2,53 e 9,13, respectivamente no Lago Moura e no Lago Mussurá (Figura 03 - B).

O número de vírus nos lagos esteve correlacionado a abundância bacteriana ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,53$ ;  $n = 27$ ) (Figura 04). Vírus e bactérias foram diretamente relacionados com a disponibilidade de fósforo nos ambientes. Lagos eutróficos, com concentração de fósforo maior do que  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , (VOLLENWEIDER e KERKES, 1980) foram estatisticamente diferenciados, dos lagos mesotróficos, concentração de fósforo entre 10 e  $30 \mu\text{g L}^{-1}$ , em relação ao número de vírus e bactérias (teste t;  $p < 0,05$ ). As maiores

abundâncias ocorreram nos ambientes mais enriquecidos em fósforo (Figura 05). Não foi encontrada relação entre a abundância de vírus ou bactérias e as concentrações de nitrogênio total.

Não foi verificada correlação entre a abundância viral e a concentração de carbono orgânico dissolvido (COD), ou entre a abundância viral e o carbono inorgânico dissolvido (CID). Foi observada a relação entre a abundância bacteriana e a concentração de COD ( $p < 0,05$ ;  $r^2 = 0,22$ ;  $n = 27$ ), entretanto, não foi verificada correlação entre o número de bactérias e a concentração de carbono inorgânico dissolvido.



## Discussão

Ferreira (FERREIRA, E.J.G., 1993) demonstrou que no curso superior do rio Trombetas as chuvas influenciam a variação do nível das águas, enquanto no curso inferior o nível é regulado pelo represamento causado pelo rio Amazonas. O represamento do Amazonas influencia primeiro os lagos mais próximos ao encontro dos dois rios, uma vez que a enchente dá no sentido contrário ao fluxo do rio Trombetas. Durante a vazante ocorre o inverso, lagos mais a montante do rio Trombetas são os primeiros a sofrerem mudanças na altura da coluna de água.

Durante o período de amostragem foi visualmente clara a mudança no período hidrológico (Figura 02), onde já se podia notar o enchimento de alguns dos lagos. Isto explica a diferença entre os lagos mais próximos e mais distantes do rio Amazonas em relação a abundância viral e bacteriana. Por já estar em período de enchimento, os lagos mais próximos ao encontro com o rio Amazonas já apresentaram a diluição do número de vírus na coluna d'água em relação aqueles mais distantes do rio Amazonas. É suposto pensar que durante a vazante, novamente os lagos mais próximos ao Amazonas apresentem menor VLP, uma vez que esta comunidade é concentrada primeiramente nos lagos mais distantes pela redução do nível de água.

Uma grande variedade de mecanismos tem sido descrito como controladores da densidade viral, afetando a inativação e/ou a redução das infecções. A queda na abundância dos vírus em ecossistemas aquáticos é causada primariamente pela radiação solar (NOBLE e FUHRMAN, 1997,

WOMMACK, et al., 1996). Por não possuírem pigmentação, os vírus possuem apenas uma fina camada protéica envolvendo o material genético, eles são vulneráveis aos danos causados pela radiação solar. Por isso, a abundância de vírus em sistemas amazônicos pode estar sendo bastante afetada pela intensa radiação solar que atinge essa área, principalmente a radiação ultravioleta. Nossos dados dão força para esta hipótese uma vez que o número de vírus encontrado nos lagos do rio Trombetas são inferiores aqueles encontrados para ecossistemas temperados onde a influência da radiação solar é menor. Entretanto, temos poucos dados para sistemas tropicais o que impede qualquer interpretação mais criteriosa e com base em dados estatísticos. É necessário mais trabalhos em ambientes tropicais, principalmente na região amazônica, para poder responder com clareza se os vírus nesses ambientes são pouco adaptados a radiação solar, ou se em outro período do pulso hidrológico a entrada de energia, principalmente alóctone, consegue fazer com que a taxa de replicação viral seja maior do que a decadência do número de vírus.

Já foi demonstrado que em ambientes onde a relação entre vírus e bactérias é forte, pode se concluir que a maioria dos vírus presente no ambiente são bacteriófagos (COCHLAN, et al., 1993, PROCTOR e FUHRMAN, 1990), (KEPNER, et al., 1998, MARANGER e BIRD, 1995). Esta relação foi encontrada em todos os lagos estudados. O que sugere que também na Amazônia a maioria dos vírus que estão nos ecossistemas aquáticos são bacteriófagos e, portanto estão sujeitos as perturbações causadas por fatores que influenciam a comunidade bacteriana. É suposto pensar que, por estarem relacionados à comunidade bacteriana, os vírus respondam na mesma

intensidade as perturbações causadas a esta comunidade. Isto justifica a pouca variabilidade da razão vírus bactérias (VBR), apesar da grande variação do número de bactérias e vírus entre lagos.

O número de vírus dentro da célula hospedeira, a taxa de infecção e fatores que influenciam na perda e na produção de vírus e bactérias influenciam na VBR (WOMMACK e COLWELL, 2000). As maiores razões vírus/bactérias (VBR) foram encontradas em lagos com baixo COD, sugerindo que a mortalidade de bactéria causada por vírus é menor em lagos húmicos, ou seja, com maior disponibilidade de carbono. Alguns trabalhos sugerem que a infecção e/ou a replicação viral pode ser afetada negativamente pela presença de substâncias húmicas, pois os vírus podem ser adsorvidos pela matéria húmica, inibindo a infecção e/ou a replicação (LU, et al., 2002).

O carbono orgânico dissolvido em ambientes aquáticos amazônicos pode ser sustentado por fontes internas e externas. Fontes com origens diferentes de carbono causam respostas diferenciadas no metabolismo bacteriano e na atividade viral (ANESIO, et al., 2004). As mudanças sazonais na coluna d'água causam mudanças consideráveis nas propriedades físicas, físico-químicas e biológicas nos lagos e rios. Durante o período de águas altas os ecossistemas aquáticos invadem a floresta tropical recebendo nutrientes, matéria orgânica dissolvida e criando novos habitats para as espécies. Neste período a produção fitoplanctônica é baixa e a maioria do COD é composto por substâncias húmicas derivadas da decomposição da matéria orgânica alóctone depositada na floresta durante o período de águas baixas (FARJALLA, et al., 2006).

Durante o período de águas baixas ocorre a concentração de nutrientes (ROLAND e ESTEVES, 1993) e o aumento da densidade de organismos na coluna d'água. Neste período a carga de nutrientes do sedimento para a coluna d'água é intensificada (ROLAND e ESTEVES, 1993). Fontes de carbono autóctone, originado pela produção primária, passam a contribuir significativamente para a concentração e a composição do COD nos ecossistemas aquáticos (FARJALLA, et al., 2006). Durante o nosso estudo, foi encontrada a relação entre a abundância bacteriana e o COD, porém nenhuma correlação foi observada entre a densidade viral e o COD.

A relação entre a VLP e o carbono orgânico dissolvido está longe de ser entendida pela comunidade científica. Alguns autores sugerem que a relação existe e é positiva (LAYBOURN-PARRY, et al., 2001). Outros autores demonstraram que esta relação não é significativa (MARANGER e BIRD, 1995). É esperado que fatores que governem a abundância bacteriana influenciem de maneira indireta a VLP, uma vez que estas duas comunidades estão intimamente relacionadas. Sendo assim, o carbono de origem autóctone pode não estar influenciando a abundância viral de maneira direta, mas sim de maneira indireta através da influência causada na comunidade bacteriana.

Baixas concentrações de fósforo e nitrogênio são consideradas um dos principais limitadores do crescimento bacteriano em muitos ecossistemas aquáticos (FARJALLA, et al., 2002, SKOOG, et al., 1999). Farjalla, (FARJALLA, et al., 2006), demonstrou que o crescimento bacteriano em um lago amazônico de águas claras também é limitado por fósforo. A relação entre a VLP e a concentração de nutrientes, já foi mostrada por muitos autores como sendo

uma relação direta, onde lagos mais eutróficos apresentam maior abundância de vírus (BETTAREL, et al., 2004). Lagos mais enriquecidos em fósforo apresentam maior taxa de infecção, maior número de vírus liberados na lise celular e por consequência maior número de vírus livres (HEWSON, et al., 2001, WEINBAUER e SUTTLE, 1999).

Finalmente concluímos que nos lagos amazônicos de águas claras a maioria dos vírus presentes são bacteriófagos e que o pulso de inundação, a grande incidência de radiação solar e a comunidade bacteriana controlam a abundância viral nestes sistemas.

Tabela 1 – Caracterização dos lagos amostrados no rio Trombetas durante o período de águas baixas.

Lagos	Área (Km2)	Perímetro (km)	Distância do Rio Amazonas (Km)	Temp. (°C)	pH	Oxigênio (%)	Prof. (m)	Secchi (m)	PT (ug/L)	NT (ug/L)	DOC (mg/L)	DIC (mg/L)
Lago Sapucua	188.3	180	33	29	7.7	71	2.2	0.4	87	577	4.6	2.7
Lago Jibóia	7.1	26	57	31	6.3	88	1.7	1.3	26	240	3.4	1.0
Lago Laguinho	0.4	8	68	34	5.0	91	1.4	1.0	24	461	4.8	1.0
Lago Aracuá	2.1	18	73	30	6.1	88	1.9	0.8	30	329	3.8	1.3
Lago Carimun	10.5	66	71	32	5.1	86	1.9	1.1	34	539	3.3	0.8
Lago Bacabau	3.6	15	81	31	5.5	76	1.9	1.2	28	363	4.6	1.5
Lago Acari	12.3	40	90	31	5.1	74	3.7	2.1	12	283	3.4	1.0
Lago Flexal	5.4	20	93	31	5.3	82	2.4	0.9	31	503	-	1.1
Lago Batata	22.3	54	96	29	6.3	79	3.0	1.2	-	-	5.4	1.7
Lago Mussurá	5.2	18	102	30	6.4	73	2.4	0.5	27	469	-	1.8
Lago Ajudante	8.3	25	109	31	5.9	81	1.9	1.2	23	452	3.5	1.3
Lago Moura	11.9	46	114	31	5.4	78	5.0	2.1	29	425	3.7	0.7
Lago Matheus	1.5	11	118	33	5.2	90	1.6	1.6	30	568	5.6	0.8
Lago Erepecu	130.6	275	121	32	5.9	83	4.2	1.3	27	426	4.3	1.0
Lago Palhau	2.3	25	129	30	5.5	62	2.3	1.3	39	352	4.1	-
Lago Juquiri-Grande	9.3	39	133	31	5.4	80	3.4	1.8	29	279	4.1	1.0
Lago Curuça-Mirin	2.6	16	149	32	5.2	80	2.9	1.9	37	504	4.2	1.1
Lago Curuça-Grande	2.3	16	144	32	5.5	82	2.1	1.7	24	510	5.5	1.1
Lago Juquiri-Mirim	2.7	18	144	31	5.2	82	2.3	1.6	14	359	3.5	1.4
Lago Mãe-quer	7.0	46	163	31	5.5	76	2.8	2.0	50	608	4.5	1.4
Lago Tapaginha	0.6	5	168	30	5.4	74	2.0	1.4	16	304	4.4	1.4
Lago Tapagem-Grande	3.3	21	173	29	5.4	75	4.0	1.7	18	364	4.7	1.5
Lago Farias	6.9	46	179	33	4.6	91	1.5	1.3	30	660	7.0	1.5
Lago Jacaré	6.2	62	180	33	5.3	90	2.1	1.0	41	577	5.4	1.3
Lago Abui	27.0	93	190	32	5.5	85	2.5	1.7	18	417	4.0	0.9
Lago Macaco	3.5	38	198	30	5.7	57	2.3	1.6	37	609	6.6	2.5

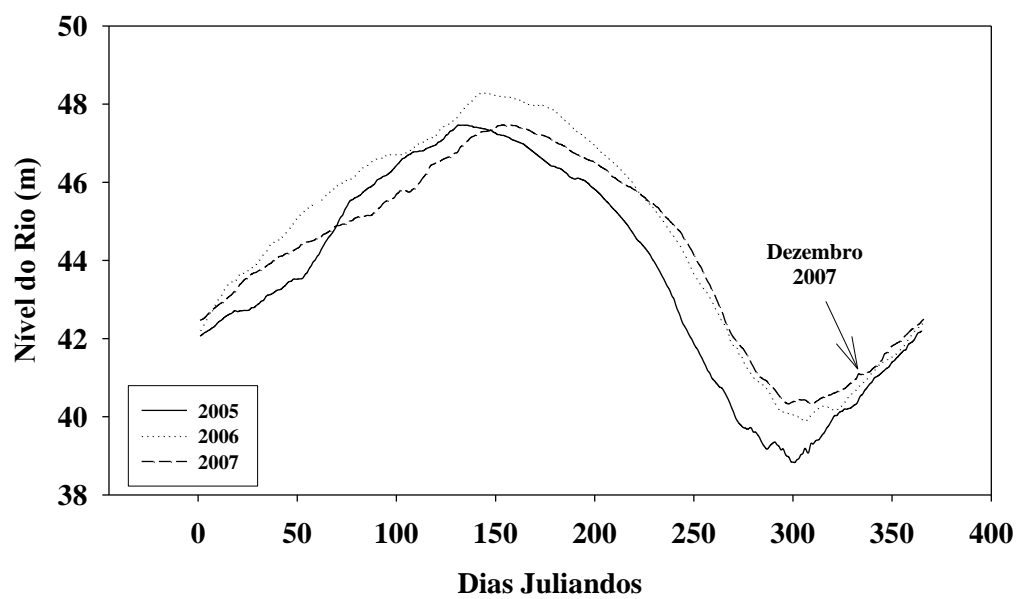


Figura 1 – Variação do nível do rio Trombetas nos anos de 2005, 2006 e 2007. A seta indica o momento das coletas realizadas nos lagos do rio Trombetas durante o ano de 2007, note que no momento das coletas o nível do rio já estava subindo.

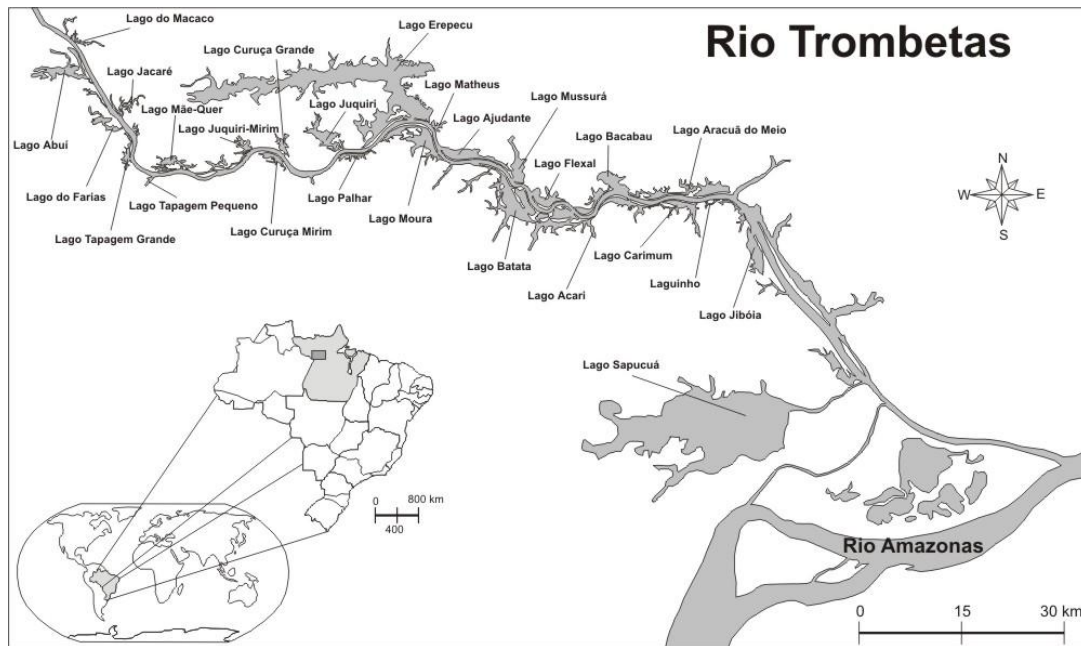


Figura 2- Localização dos lagos amostrados.



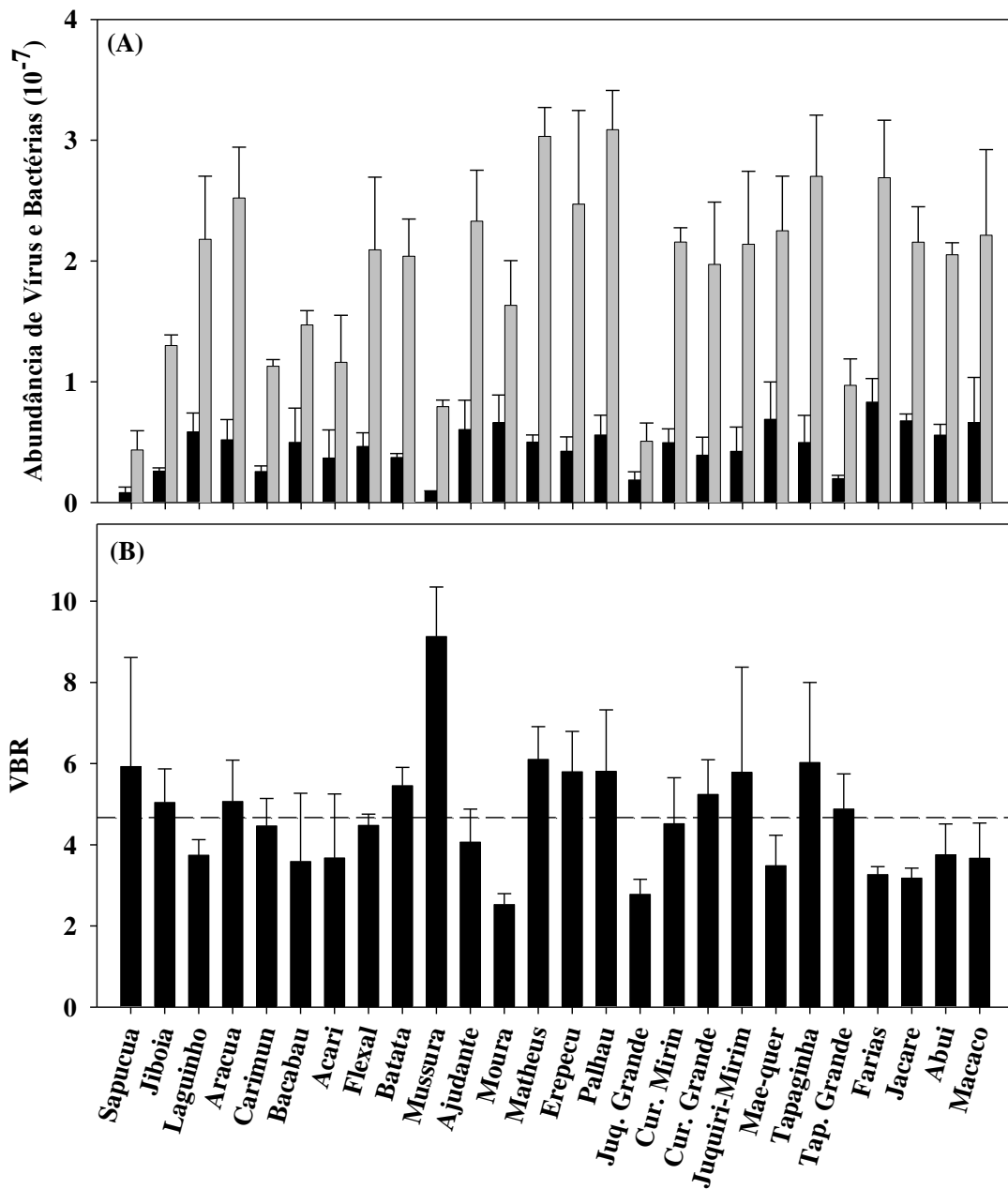


Figura 3 – Variação do número de vírus, bactérias e da VBR. (A) Abundância de vírus (barras cinzas), bactérias (barras pretas) nos lagos amostrados. O número de vírus superou em cerca de uma ordem de grandeza o número de bactérias. (B) Apesar da grande variabilidade do número de vírus e bactérias, a VBR foi praticamente constante ao longo dos lagos, a linha representa a média dos valores ( $4,67 \pm 1,41$ ).

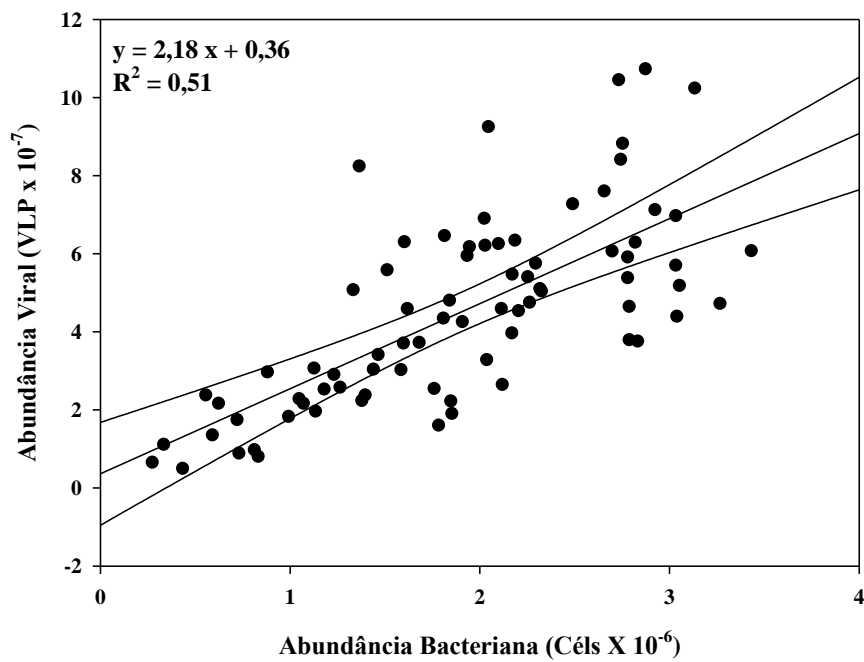


Figura 4 - Correlação entre a abundância viral e a abundância bacteriana. Uma vez que a abundância de vírus está relacionada a abundância bacteriana, é possível dizer que a maioria dos vírus presentes nos lagos do rio Trombetas são bacteriófagos e por tanto estão vulneráveis a parâmetros que possam influenciar a abundância bacteriana.

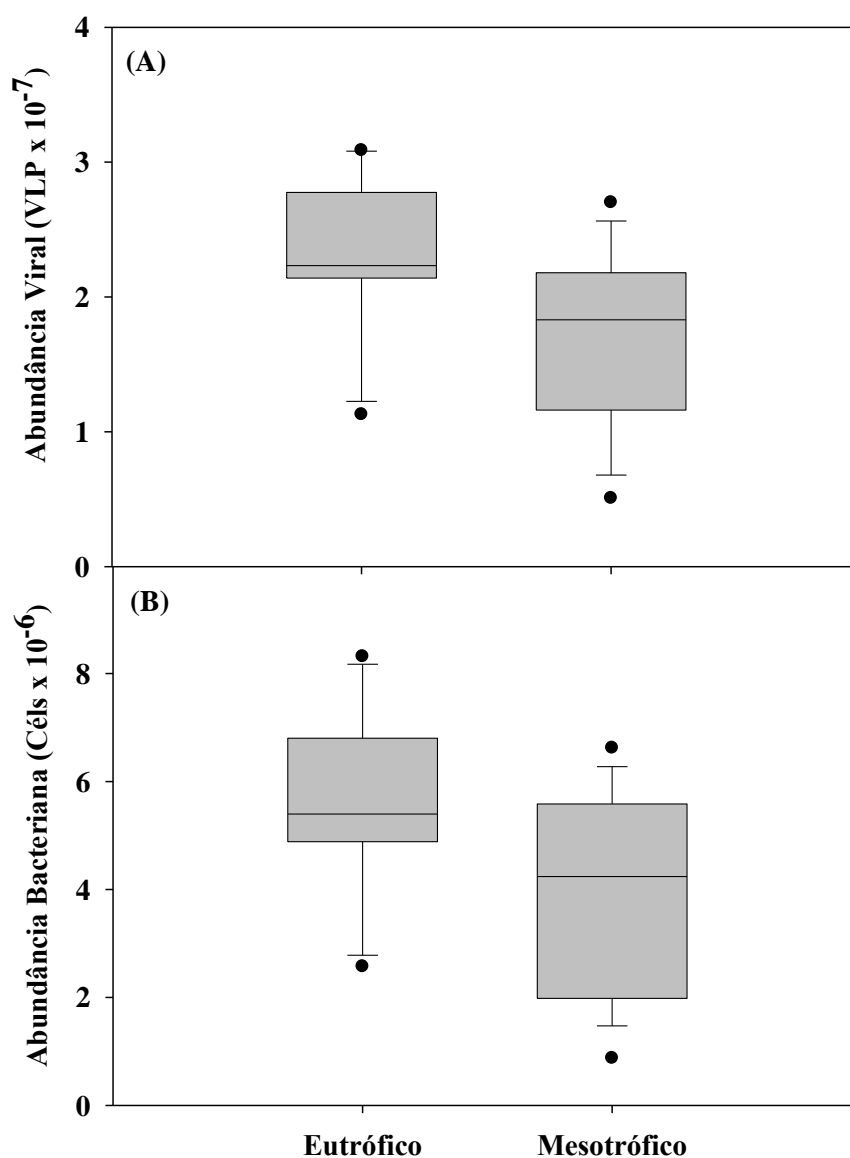


Figura 5 – Distribuição da abundância viral e bacteriana em lagos eutróficos e mesotróficos. A abundância viral e bacteriana foi significativamente maior em lagos com concentração de fósforo acima de 30 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ) lagos eutróficos, do que em lagos com concentração de fósforo menor do que 30 ( $\mu\text{g L}^{-1}$ ), lagos mesotróficos.

## Discussão Geral

Assim como já foi mostrado para outros ambientes, a maioria dos vírus presentes nos lagos amazônicos de águas claras são bacteriófagos e, portanto, estão suscetíveis às mudanças causadas por perturbações na comunidade bacteriana.

Os vírus, desde que foram incorporados no conceito da alça microbiana, exercem um papel fundamental no controle de populações, na ciclagem de nutrientes e no fluxo de energia nos ecossistemas aquáticos. Hoje o que se propõe é o conceito de alça viral, onde os vírus são responsáveis pelo curto-circuito dos nutrientes liberando compostos para as bactérias heterotróficas. Uma vez que eles são responsáveis pela lise celular tanto de células bacterianas quanto de células fitoplanctônicas, eles liberam para o meio nutriente e principalmente o carbono que estava “preso” no interior das células. Se a célula a sofrer lise for uma bactéria, outra bactéria irá absorver os compostos liberados, formando um circuito entre bactérias. Este processo, apesar de bem simples, está sendo descrito como sendo de grande importância para o funcionamento dos ecossistemas aquáticos.

Existe tanto uma variação espacial quanto uma variação temporal em relação a abundância de vírus em ecossistemas aquáticos amazônicos de águas claras. A variação temporal é regida principalmente pela ação do pulso de inundação, uma vez que em períodos de águas altas o número de vírus fica diluído na coluna d'água, enquanto que no período de águas baixas ocorre a concentração dos vírus. A variação espacial é governada por um somatório de

fatores como: fósforo, nitrogênio, turbidez, luz, carbono, profundidade, localização do lago, entre outros. Estes fatores criam habitats que propiciam o aumento do número de vírus, seja de maneira direta, ou seja, de maneira indireta através do benefício a comunidades de bactérias ou do fitoplâncton.

Apesar de haver as variações espaciais e temporais em relação ao número de vírus (VLP) e o número de bactérias, a razão vírus/bactérias (VBR) se manteve estável tanto entre os lagos, quanto entre os períodos do pulso hidrológico. A VBR em todos os sistemas esteve inversamente relacionado a concentração de COD, indicando que lagos húmicos apresentam menor taxa de mortalidade bacteriana causa por vírus. A VBR é uma medida simples que indica a quantidade de vírus que podem atacar uma bactéria. Alta VBR é resultado de altas taxas de infecção e liberação de vírus e pequeno decaimento do número de vírus, por outro lado, baixa VBR é fruto de maior perda de vírus livres e menor taxa de infecção e liberação de vírus.

O número de vírus dentre outros fatores está inversamente relacionado à quantidade de radiação que chega aos ecossistemas aquáticos. Regiões tropicais apresentam maior incidência de radiação solar quando comparada a região temperada. Com isso, é esperado que ecossistemas tropicais apresentem menor abundância de vírus do que ecossistemas localizados em regiões temperadas. Entretanto, apesar das poucas referências sobre a VLP em lagos tropicais reforçarem essa hipótese, não se pode confirmar tal hipótese com respaldo científico, por haver poucos dados de abundância de vírus em ecossistemas tropicais. É necessário que mais trabalhos possam ser realizados em ambientes tropicais para comparar os ambientes e concluir se os

vírus presentes nos sistemas tropicais são pouco adaptados ou não a radiação solar.

Nossos dados são uma forte evidência que também na Amazônia os vírus são controladores do número de bactérias e que eles também são os organismos mais abundantes dos sistemas aquáticos. Por estarem extremamente associados às bactérias, os vírus estão sujeitos a responderem a perturbações na comunidade bacteriana. Tanto fatores de origem antrópica como o lançamento de rejeito de bauxita, quanto os fatores naturais como o enriquecimento por fósforo e nitrogênio e o pulso de inundação afetam a comunidade bacteriana e por consequência afetam o número de vírus.

É necessário que mais trabalhos sejam desenvolvidos nos ecossistemas aquáticos tropicais, e em especial no Brasil, para que possamos inferir sobre a ecologia do vírus nestes ambientes e conhecer suas implicações na comunidade microbiana.

## Referências

- AMON, R. M. W. and R. BENNER, 1996, "Bacterial utilization of different size classes of dissolved organic matter". *Limnology and Oceanography*, 41, 41-51.
- ANESIO, A. M., P. C. ABREU and F. D. ESTEVES, 1997, "Influence of the hydrological cycle on the bacterioplankton of an impacted clear water Amazonian lake". *Microbial Ecology*, 34, 66-73.
- ANESIO, A. M., C. HOLLAS, W. GRANALI and J. LAYBOURN-PARRY, 2004, "Influence of humic substances on bacterial and viral dynamics in freshwaters". *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 4848-4854.
- BERGH, O., K. Y. BORSHEIM, G. BRATBAK and M. HELDAL, 1989, "High Abundance of Viruses Found in Aquatic Environments". *Nature*, 340, 467-468.
- BETTAREL, Y., M. BOUVY, C. DUMONT and T. SIME-NGANDO, 2006, "Virus-bacterium interactions in water and sediment of West African inland aquatic systems". *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 5274-5282.
- BETTAREL, Y., T. SIME-NGANDO, C. AMBLARD and J. DOLAN, 2004, "Viral activity in two contrasting lake ecosystems". *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2941-2951.
- BOZELLI, R. L., 1994, "Zooplankton Community Density in Relation to Water-Level Fluctuations and Inorganic Turbidity in an Amazonian Lake, Lago-Batata, State of Para, Brazil". *Amazoniana-Limnologia Et Oecologia Regionalis Systemae Fluminis Amazonas*, 13, 17-32.
- BOZELLI, R. L., 1996, "The influence of bauxite tailings on the cladoceran populations of Lake Batata, Amazonia, Brazil". *Internationale Revue Der Gesamten Hydrobiologie*, 81, 621-634.
- BRATBAK G, E. JK and H. M, 1993, "Viral mortality of the marine alga *Emiliana huxleyi* (Haptophyceae) and termination of algal blooms." *Mar Ecol Prog Ser*, 93, 3948.
- BRATBAK, G. and M. HELDAL, 2000, "Viruses rule the waves – the smallest and most abundant members of marine ecosystems". *Microbiology Today*, 27, 171-173.
- BRUSSAARD, C. P. D., 2004, "Viral control of phytoplankton populations - a review". *Journal of Eukaryotic Microbiology*, 51, 125-138.
- COCHLAN, W. P., J. WIKNER, G. F. STEWARD, D. C. SMITH and F. AZAM, 1993, "Spatial-Distribution of Viruses, Bacteria and Chlorophyll-a in Neritic, Oceanic and Estuarine Environments". *Marine Ecology-Progress Series*, 92, 77-87.

ENRICH-PRAST, A., F. D. A. ESTEVES, D. D. BIESBOER, R. L. BOZELLI and V. F. FARJALLA, 2006, "The influence of bauxite tailings on the growth and development of *Oryza glumaepatula* in an amazonian lake". *Hydrobiologia*, 563, 87-97.

FARJALLA, V. F., D. A. AZEVEDO, F. A. ESTEVES, R. L. BOZELLI, F. ROLAND and A. ENRICH-PRAST, 2006, "Influence of hydrological pulse on bacterial growth and DOC uptake in a clear-water Amazonian lake". *Microbial Ecology*, 52, 334-344.

FARJALLA, V. F., F. A. ESTEVES, R. L. BOZELLI and F. ROLAND, 2002, "Nutrient limitation of bacterial production in clear water Amazonian ecosystems". *Hydrobiologia*, 489, 197-205.

FERREIRA, E. J. G., 1992, "Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da futura UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil." *Acta Amazonica*, 23 1 (4), 88.

FERREIRA, E. J. G., 1993, "Composição, distribuição e aspectos ecológicos da ictiofauna de um trecho do rio Trombetas, na área de influência da futura UHE Cachoeira Porteira, Estado do Pará, Brasil." *Acta Amazonica*, 23 1 (4), 88.

FUHRMAN, J. A., 1999, "Marine viruses and their biogeochemical and ecological effects". *Nature*, 399, 541-548.

FUHRMAN, J. A. and R. T. NOBLE, 1995, "Viruses and protists cause similar bacterial mortality in coastal seawater". *Limnology and Oceanography*, 40, 1236-1242.

HENNES, K. P. and M. SIMON, 1995, "Significance of Bacteriophages for Controlling Bacterioplankton Growth in a Mesotrophic Lake". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 333-340.

HEWSON, I., J. M. O'NEIL, J. A. FUHRMAN and W. C. DENNISON, 2001, "Virus-like particle distribution and abundance in sediments and overlying waters along eutrophication gradients in two subtropical estuaries". *Limnology and Oceanography*, 46, 1734-1746.

JUNK, W. J., 1989, "The Use of Amazonian Floodplains under an Ecological Perspective". *Interciencia*, 14, 317-322.

JUNK, W. J., P. B. BAYLEY and R. E. SPARKS, 1989, "The flood pulse concept in river-floodplain system." *In: Dodge, DP (Ed.) Proceedings of the International Large Rivers Symposium (LARS). Can Spec Publ Fish Aquat Sci*, 106, 110-127.

KEPNER, R. L., R. A. WHARTON and C. A. SUTTLE, 1998, "Viruses in antarctic lakes". *Limnology and Oceanography*, 43 (7), 1754-1761.



LAYBOURN-PARRY, J., J. S. HOFER and R. SOMMARUGA, 2001, "Viruses in the plankton of freshwater and saline Antarctic lakes". *Freshwater Biology*, 46, 1279-1287.

LEAL, J. J. F., F. A. ESTEVES and M. CALLISTO, 2004, "Distribution of Chironomidae larvae in an Amazonian flood-plain lake impacted by bauxite tailings (Brazil)". *Amazoniana-Limnologia Et Oecologia Regionalis Systemae Fluminis Amazonas*, 18, 109-123.

LENSKI, R. E., 1988, "Dynamics of Interactions between Bacteria and Virulent Bacteriophage". *Advances in Microbial Ecology*, 10, 1-44.

LU, F. J., S. N. TSENG, M. L. LI and S. R. SHIH, 2002, "In vitro anti-influenza virus activity of synthetic humate analogues derived from protocatechuic acid". *Archives of Virology*, 147, 273-284.

MADAN, N. J., W. A. MARSHALL and J. LAYBOURN-PARRY, 2005, "Virus and microbial loop dynamics over an annual cycle in three contrasting Antarctic lakes". *Freshwater Biology*, 50, 1291-1300.

MARANGER, R. and D. F. BIRD, 1995, "Viral Abundance in Aquatic Systems - a Comparison between Marine and Fresh-Waters". *Marine Ecology-Progress Series*, 121, 217-226.

MARANGER, R., D. F. BIRD and S. K. JUNIPER, 1994, "Viral and Bacterial Dynamics in Arctic Sea-Ice during the Spring Algal Bloom near Resolute, Nwt, Canada". *Marine Ecology-Progress Series*, 111, 121-127.

MATHIAS, C. B., A. K. T. KIRSCHNER and B. VELIMIROV, 1995, "Seasonal-Variations of Virus Abundance and Viral Control of the Bacterial Production in a Backwater System of the Danube River". *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3734-3740.

NOBLE, R. T. and J. A. FUHRMAN, 1997, "Viral decay and its causes in coastal waters." *Applied and Environmental Microbiology*, 63 (1), 77-83.

NOBLE, R. T. and J. A. FUHRMAN, 1998, "Use of SYBR Green I for rapid epifluorescence counts of marine viruses and bacteria". *Aquatic Microbial Ecology*, 14, 113-118.

ORTMANN, A. C., J. E. LAWRENCE and C. A. SUTTLE, 2002, "Lysogeny and lytic viral production during a bloom of the cyanobacterium *Synechococcus* spp." *Microbial Ecology*, 43, 225-231.

PATEL, A., R. T. NOBLE, J. A. STEELE, M. S. SCHWALBACH, I. HEWSON and J. A. FUHRMAN, 2007, "Virus and prokaryote enumeration from planktonic aquatic environments by epifluorescence microscopy with SYBR Green I". *Nat. Protocols*, 2, 269-276.

- PEDUZZI, P. and F. SCHIEMER, 2004, "Bacteria and viruses in the water column of tropical freshwater reservoirs". *Environmental Microbiology*, 6, 707-715.
- PROCTOR, L. M. and J. A. FUHRMAN, 1990, "Viral Mortality of Marine-Bacteria and Cyanobacteria". *Nature*, 343, 60-62.
- PROCTOR, L. M. and J. A. FUHRMAN, 1992, "Mortality of Marine-Bacteria in Response to Enrichments of the Virus Size Fraction from Seawater". *Marine Ecology-Progress Series*, 87, 283-293.
- ROLAND, F., N. F. CARACO and J. J. COLE, 1999, "Rapid and precise determination of dissolved oxygen by spectrophotometry: Evaluation of interference from color and turbidity". *Limnology and Oceanography*, 44, 1148-1154.
- ROLAND, F. and F. D. ESTEVES, 1998, "Effects of bauxite tailing on PAR attenuation in an Amazonian crystalline water lake". *Hydrobiologia*, 377, 1-7.
- ROLAND, F., F. D. ESTEVES and F. A. R. BARBOSA, 2002, "Relationship between antropogenically caused turbidity and phytoplankton production in a clear Amazonian floodplain lake". *Amazoniana-Limnologia Et Oecologia Regionalis Systemae Fluminis Amazonas*, 17, 65-77.
- RUARDIJ, P., M. J. W. VELDHUIS and C. P. D. BRUSSAARD, 2005, "Modeling the bloom dynamics of the polymorphic phytoplankter *Phaeocystis globosa*: impact of grazers and viruses". *Harmful Algae*, 4, 941-963.
- SKOOG, A., B. BIDDANDA and R. BENNER, 1999, "Bacterial utilization of dissolved glucose in the upper water column of the Gulf of Mexico". *Limnology and Oceanography*, 44, 1625-1633.
- STEWARD, G. F., D. C. SMITH and F. AZAM, 1996, "Abundance and production of bacteria and viruses in the Bering and Chukchi Seas". *Marine Ecology-Progress Series*, 131, 287-300.
- SUTTLE, C. A., 1994, "The Significance of Viruses to Mortality in Aquatic Microbial Communities". *Microbial Ecology*, 28, 237-243.
- SUTTLE, C. A., 2005, "Viruses in the sea". *Nature*, 437, 356-361.
- SUTTLE, C. A., A. M. CHAN and M. T. COTTRELL, 1990, "Infection of Phytoplankton by Viruses and Reduction of Primary Productivity". *Nature*, 347, 467-469.
- VOLLENWEIDER, R. A. and J. KERKES, 1980, "The Loading Concept as Basis for Controlling Eutrophication Philosophy and Preliminary-Results of the Oecd Program on Eutrophication". *Progress in Water Technology*, 12, 5-38.

VREDE, K., U. STENSDOTTER and E. S. LINDSTROM, 2003, "Viral and bacterioplankton dynamics in two lakes with different humic contents". *Microbial Ecology*, 46, 406-415.

WATERBURY, J. B. and F. W. VALOIS, 1993, "Resistance to Cooccurring Phages Enables Marine Synechococcus Communities to Coexist with Cyanophages Abundant in Seawater". *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 3393-3399.

WEINBAUER, M. G., D. FUKS and P. PEDUZZI, 1993, "Distribution of Viruses and Dissolved DNA Along a Coastal Trophic Gradient in the Northern Adriatic Sea". *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4074-4082.

WEINBAUER, M. G. and M. G. HOFLE, 1998, "Size-specific mortality of lake bacterioplankton by natural virus communities". *Aquatic Microbial Ecology*, 15, 103-113.

WEINBAUER, M. G. and P. PEDUZZI, 1995, "Significance of Viruses Versus Heterotrophic Nanoflagellates for Controlling Bacterial Abundance in the Northern Adriatic Sea". *Journal of Plankton Research*, 17, 1851-1856.

WEINBAUER, M. G. and C. A. SUTTLE, 1999, "Lysogeny and prophage induction in coastal and offshore bacterial communities". *Aquatic Microbial Ecology*, 18, 217-225.

WILHELM, S. W. and R. E. H. SMITH, 2000, "Bacterial carbon production in Lake Erie is influenced by viruses and solar radiation". *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57, 317-326.

WILHELM, S. W. and C. A. SUTTLE, 1999, "Viruses and Nutrient Cycles in the Sea - Viruses play critical roles in the structure and function of aquatic food webs". *Bioscience*, 49, 781-788.

WILHELM, S. W., M. G. WEINBAUER, C. A. SUTTLE and W. H. JEFFREY, 1998, "The role of sunlight in the removal and repair of viruses in the sea". *Limnology and Oceanography*, 43, 586-592.

WOMMACK, K. E. and R. R. COLWELL, 2000, "Virioplankton: Viruses in aquatic ecosystems". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 69-+.

WOMMACK, K. E., R. T. HILL, T. A. MULLER and R. R. COLWELL, 1996, "Effects of sunlight on bacteriophage viability and structure". *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1336-1341.

YAGER, P. L., T. L. CONNELLY, B. MORTAZAVI, K. E. WOMMACK, N. BANO, J. E. BAUER, S. OPSAHL and J. T. HOLLIBAUGH, 2001, "Dynamic bacterial and viral response to an algal bloom at subzero temperatures". *Limnology and Oceanography*, 46, 790-801.