Elisabeth Mendes Martins de Moura

Diversidade de vírus DNA autóctones e alóctones de mananciais e de esgoto da região metropolitana de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Doutor em Ciências.

São Paulo
2017

Elisabeth Mendes Martins de Moura

Diversidade de vírus DNA autóctones e alóctones de mananciais e de esgoto da região metropolitana de São Paulo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Titulo de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Microbiologia

Orienta: Prof (a). Dr (a). Dolores Ursula Mehnert
versão original

São Paulo
2017

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Moura, Elisabeth Mendes Martins de
Diversidade de vírus DNA autóctones e alóctones de mananciais e de esgoto da região metropolitana de São Paulo / Elisabeth Mendes Martins de Moura; orientador Dolores Ursula Mehnert. -- São Paulo, 2017.
131 p.

Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Água de Manancial. 2. Esgoto. 3. Metagenômica. 4. Vírus de DNA autóctones. 5. Vírus de DNA alóctones. I. Mehnert, Dolores Ursula , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Elisabeth Mendes Martins de Moura

Título da Tese: Diversidade de vírus DNA autóctones e alóctones de mananciais e de esgotos da região metropolitana de São Paulo

Orientador(a): Prof(a). Dr. Dolores Ursula Mehnert

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

ICB USP

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.156/2017

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado de Isenção protocolo **CEP-ICB nº 751/2015**, informo que o título do projeto foi alterado para ***"Diversidade de vírus DNA autóctones de mananciais e de esgoto da região metropolitana de São Paulo"*** sob a responsabilidade da aluna **Elisabeth Mendes Martins de Moura** e orientação da Profa. Dra. **Dolores Ursula Mehnert**, do Departamento de Microbiologia, sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 22 de agosto de 2017.

Profa. Dra. **Luciane Valéria Sita**
Coordenadora da CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. **Camila Squarzoni Dale**
Coordenadora do CEPSH - ICB/USP

AGRADECIMENTOS

A Dra. Dolores Ursula Mehnert por me proporcionar a chance de conhecer uma área nova e rica que é a virologia.

A Dra. Telma Alves Monezi pelos conhecimentos adquiridos, pelo carinho, companheirismo e pela amizade que hoje nós temos.

A bióloga Beatriz Viana da SABESP pelo auxílio na análise de fitoplanctos

Ao Dr. Paolo Marinho de Andrade Zanotto, Caio César de Melo Freire e Daniel Ferreira de Lima Neto pelos suporte bioinformático.

A Dra. Carla Torres Braconi pela suporte no sequenciamento das amostras.

Ao Dr. Enrique Mario Boccardo Pierulivo pelas conversas e incentivo.

A Bruna, Valesca, Walason pelos cafés e amizade

A Camila, Licia Helena, Adriana, Luisa e Miriam pelos longos momentos de conversas e amizades.

Ao CEFAP e ESALQ pelo suporte técnico.

Ao Instituto Ciências Biomédica pelo programa de pós-graduação, como também pelo auxilio da Gisele da Graça Santana, secretária da pós-graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

RESUMO

MOURA, E. M. M**. Diversidade de vírus DNA autóctones e alóctones de mananciais e de esgoto da região metropolitana de São Paulo**. 2017. 134f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A água doce no Brasil, assim como o seu consumo é extremamente importante para as diversas atividades criadas pelo ser humano. Por esta razão o consumo deste bem é muito grande e consequentemente, provocando o seu impacto. Os mananciais são normalmente usados para abastecimento doméstico, comercial, industrial e outros fins. Os estudos na área de ecologia de micro-organismos nos ecossistemas aquáticos (mananciais) e em esgotos vêm sendo realizados com mais intensidade nos últimos anos. Nas últimas décadas foi introduzido o conceito de virioplâncton com base na abundância e diversidade de partículas virais presentes no ambiente aquático. O virioplâncton influencia muitos processos ecológicos e biogeoquímicos, como ciclagem de nutriente, taxa de sedimentação de partículas, diversidade e distribuição de espécies de algas e bactérias, controle de florações de fitoplâncton e transferência genética horizontal. Os estudos nesta área da virologia molecular ainda estão muito restritos no país, bem como muito pouco se conhece sobre a diversidade viral na água no Brasil. O objetivo do trabalho foi caracterizar os vírus autóctones e alóctones presentes em águas de manancial e de esgoto contaminado por lançamento de esgoto na região metropolitana de São Paulo utilizando análise metagenônica. Preliminarmente foram avaliados métodos para purificação das amostras ambientais e extração de DNA. Em seguida, amostras de água do manancial de São Lourenço da Serra e da represa Guarapiranga, bem como água de esgoto de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra, coletadas no período de janeiro a dezembro de 2013, concentradas e purificadas tiveram o DNA extraído. Para a extração foi utilizado o kit *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®) e sequenciado no aparelho Hiseq 2500 System da Illumina. Os resultados foram detectados 6 família de vírus capazes de infectar Dominio Eukaryota e 7 famílias de vírus capazes de infectar os domínios Bacteria e Archaea. Apesar do lançamento de esgoto nos rios e mananciais e esses conter patógenos virais que na sua maioria são vírus de RNA o presente trabalho conseguiu identificar sequencias de uma grande variedade de vírus DNA autóctones do ambiente contribuindo para o melhor conhecimento do ecossistemas aquáticos da RMSP.

Palavras-chave: Água de Manancial. Água de esgoto. Metagenômica. Diversidade viral. Água da RMSP.

ABSTRACT

MOURA, E. M. M. **Diversity of autochthonous DNA viruses and alóctones of springs and sewage of the metropolitan region of São Paulo**. 2017. 132p. ph.D. thesis (Microbiology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017

Freshwater in Brazil, as well as its consumption is extremely important for the various activities created by the human being. For this reason the consumption of this good is very great and consequently, causing its impact. The sources are usually used for domestic, commercial, industrial and other purposes. Studies on the ecology of microorganisms in waters (freshwater and sewage) have been carried out more intensively in recent years. In recent decades the concept of virioplankton has been introduced based on the abundance and diversity of viral particles present in the aquatic environment. Virioplankton influences many ecological and biogeochemical processes, such as nutrient cycling, particle sedimentation rate, diversity and distribution of algal and bacterial species, control of phytoplankton blooms and horizontal gene transfer. Studies in this area of molecular virology are still very restricted in the country, and very little is known about viral diversity in water in Brazil. The objective of this work was to characterize the autochthonous and allochthonous viruses present in springwater and sewage contaminated by sewage in the metropolitan area of São Paulo using metagenic analysis. Methods for purifying environmental samples and extracting DNA were preliminarily evaluated. Next, water samples from the São Lourenço da Serra and Guarapiranga reservoirs, as well as sewage from Taboão da Serra, collected from January to December 2013, concentrated and purified the DNA extracted using the DNeasy Blood kit And Tissue Kit (Qiagen®) and sequenced on the Hiseq 2500 System from Illumina. The results were detected 6 family of viruses capable of infecting Eukaryota Domain and 7 families of viruses capable of infecting the prokaryotic domains Bacteria and Archaea. Despite the fact that sewage in rivers and reservoirs contain viral pathogens that are mostly RNA viruses, the present work was able to identify sequences of a wide variety of autochthonous DNA viruses from the environment, contributing to the better knowledge of the aquatic ecosystems of RMSP.

Keywords: Spring Water. Sewage water. Metagenomics. Viral diversity. RMSP water.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 11

1.1 ÁREA DE ESTUDO E AMOSTRAGEM 12

1.2 REPRESAS 14

1.3 EUTROFIZAÇÃO 16

1.4 PLÂNCTON NO AMBIENTE AQUÁTICO 18

1.4.1 Fitoplâncton no ambiente 20

1.4.2 Bacterioplâncton 22

1.4.3 Archaea 25

1.4.4 Virioplâncton 28

1.4.4.1 Vírus de DNA 31

1.4.4.1.1 Vírus de dsDNA 31

1.4.4.1.1.1 Classificação dos Caudovirales 31

1.4.4.1.1.2 Classificação de famílias sem ordem definidas 32

1.4.4.1.2 Vírus de ssDNA 32

1.4.4.1.3 Vírus dsDNA-RT 34

1.4.4.2 Vírus de RNA 34

1.4.4.2.1 Vírus de (+)ssRNA 34

1.4.4.2.2 Vírus de (-)ssRNA 35

1.4.4.2.3 Vírus de dsRNA 35

1.4.4.2.4 Vírus de ssRNA-RT 36

1.4.4.3 Importância do vírus no ambiente aquático 36

1.4.4.3.1 Vírus de Eukaryota no ambiente aquático 36

1.4.4.3.1.1 Vírus ambientais 36

1.4.4.3.1.2 Vírus patogênicos para humanos 41

1.4.4.3.2 Bacteriófagos no ambiente aquático 42

1.4.4.3.2.1 Multiplicação viral em ambientes aquáticos 46

1.4.4.3.2.2 Transferência de genes em ambientes aquáticos 49

1.4.4.3.3 Vírus de Archaea no ambiente aquático 50

1.5 METAGENÔMICA 51

1.6 HISTÓRICO DE ESTUDOS DE VÍRUS AMBIENTAIS 53

2 Objetivo 57

2.1 GERAL 57

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 57

3 Materiais e Métodos 58

3.1 ENSAIOS PARA PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA 58

3.1.1 Amostras ambientais *58*
3.1.1.1 Água de esgoto do da ETE ABC 58
3.1.1.2 Esgoto da Estação Elevatória do Parque Edu Chaves 58
3.1.1.3 Esgoto de Barueri 58
3.1.2 Processamento das amostras *59*
3.1.2.1 Águas de esgoto do ABC e de EE do Pq. Edu Chaves 59
3.1.2.3 Amostra de esgoto de Barueri 59
3.1.3 Estabelecimento dos processos de purificação das amostras para análise metagenômica *60*
3.1.3.1 Tratamento com DNAse do esgoto de Barueri 60
3.1.3.2 Purificação por filtração, Protease e Clorofórmio 60
3.1.4 Avaliações de métodos de extração de DNA para aplicação metagenômica 60
3.1.4.1 Extração Trizol e clorofórmio 61
3.1.4.1.1 Extração de DNA 61
3.1.4.1.2 Extração de RNA 61
3.1.4.1.2.1 Síntese de cDNA 62
3.1.4.2 Método de Hirt - extração seletiva de DNA viral 62
3.1.4.3 Power Soil DNA isolation kit 62
3.1.4.4 DNeasy Blood and Tissue Kit 63
3.1.5 Amplificação do DNA extraído *63*
3.1.6 Quantificações do DNA, cDNA e RNA *63*
3.1.6.1 Método espectrofotométrico - NanoDrop 2000c 63
3.1.7 Montagem da biblioteca genômica e sequenciamento por Miseq *64*
3.1.7.1 Analises das reads 64
3.1.7.2 Montagem dos contigs 64
3.1.7.3 Construção dos gráficos 64
3.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAL E ESGOTO 65
3.2.1 Origens das amostras *65*
3.2.1.1 Localização dos Mananciais e dos Esgotos 65
3.2.2 Concentração das amostras *68*
3.2.2.1 Coleta 68
3.2.2.2 Adsorção-eluição por filtração 68
3.2.3 Ultracentrifugação *68*
3.2.4 Tratamento do concentrado viral *69*
3.2.4.1 Vertrel XF ™ 69
3.2.4.2 Filtração 69
3.2.4.3 DNAse 69
3.2.4.4 Protease e Clorofórmio 69
3.2.5 Extração do DNA *70*
3.2.6 Quantificação do DNA *70*
3.2.6.1 Método fluorimétrico 70
3.2.7 Amplificação do DNA extraído *70*

3.2.8 Analise de Metagenômica *70*
3.2.8.1 Sequenciamento de nova geração Illumina® 70
3.2.8.2 Análise da qualidade das reads 71
3.2.8.3 Montagem e análise dos contigs 71
3.2.9 Caracterização fisico-química e biológica das amostras de água e esgoto *71*

4 RESULTADOS 73

4.1 ENSAIOS PARA PADRONIZAÇÃO DA METODOLOGIA 73
4.1.1 Avaliação dos métodos de Extração/purificação de ácidos nucleicos *73*
4.1.1.1 Trizol-clorofórmio 73
4.1.2 Metagenômica preliminar (Miseq) *75*
4.1.3 Resultados da implementação do processo de purificação das amostras *75*
4.2 AVALIAÇÃO DA DIVERSIDADE VIRAL EM AMOSTRAS DE ÁGUA DE MANANCIAL E ESGOTO 77
4.2.1 Qualidade de reads e contigs *77*
4.2.2 Analise dos Contigs *77*
4.2.2.1 Vírus detectados pelo sequenciamento Hiseq 80
4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUIMICA E MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ÁGUA 97

5 Discussão 101

5.1 PROCESSAMENTO DA AMOSTRA 102
5.2. ANÁLISE METAGENÔMICA 107
5.2.1 Vírus *107*

6 Conclusão 115

REFERENCIAS 116

Anexo A 131

1 INTRODUÇÃO

A água, assim como o seu consumo, tornou-se extremamente importante para as diversas atividades criadas pelo ser humano. Entre estas atividades se encontram o transporte de pessoas e mercadorias, geração de energia, produção e processamento de alimentos, processos industriais diversos, recreação, além de ser amplamente utilizada para descarte de efluentes (PINHATI, 2008).

Nota-se que a água é um bem natural e renovável, cujo volume total no globo terrestre é relativamente constante ao longo dos tempos, mas infelizmente, nos últimos anos essa distribuição está sendo alterada devido aos impactos ambientais locais e globais (HELLER; PADUA, 2006).

A principal fonte de água doce do planeta provém do escoamento de águas de superfície, que é anualmente de 44.500 Km^2 por ano, e mais da metade deste escoamento mundial ocorre na Ásia e na América do Sul, tornando, portanto, o continente sul-americano e consequentemente o Brasil uma das maiores reservas de águas interiores do planeta (RONQUI, 2008)

E como consequência dessa reserva abundante de água, no Brasil, o uso deste recurso natural é intenso, dando a ilusão, muitas vezes, que á água é um bem inesgotável, no entanto, no mundo 97 % da água existente, é água salgada e mais, a quantidade de água doce é de 3 %, e dentro deste 3 % apenas 0,3 % aproximadamente é aproveitável, pois a maior parte encontra-se na foram de neve, de gelo ou em lençóis subterrâneos situados abaixo de uma profundidade de 800 m, tornando-se inviável a utilização desse recurso (HELLER; PADUA, 2006).

Desta maneira o uso intenso e indiscriminado da água doce acarreta prejuízo tanto para os corpos d'água como para a biota aquática que vive nestas águas. Além do uso indevido da água, no Brasil, as principais fontes de degradação da água doce decorrem da liberação dos esgotos domésticos e industriais, que são lançados nos corpos de águas continentais na quase totalidade sem nenhuma forma de tratamento (ESTEVES; MENEZES, 2011).

Assim como também a ocupação do solo e desmatamento da região em volta dos lagos, reservatórios e rios provocam um aumento da degradação das águas continentais (CONTE; LEOPOLDO, 2001)

1.1 Área de Estudo e Amostragem

O presente estudo abrange três municípios do Estado de São Paulo: o município de São Paulo, onde fica situada a Represa Guarapiranga (ponto 1), o município de Taboão da Serra (ponto 2) e o município de São Lourenço da Serra no qual se encontra a Estação tratamento de Água (ETA) (ponto 3) e Estação tratamento de Esgoto (ETE) (ponto 4). No ponto 1 (Gua_Manancial) e no ponto 3 (SL_Manancial) foram coletadas amostras de água, e nos pontos 2 (TS_Esgoto) e 4 (SL_Esgoto) foram coletadas amostras de esgoto.

O estado de São Paulo possui 645 municípios e entre estes se encontra a cidade de São Paulo que é a mais populosa cidade brasileira com aproximadamente 12.038.175 habitantes. A região metropolitana é formada por 39 municípios totalizando uma população de cerca de 21,2 milhões de habitantes e onde se situa o município de Taboão da Serra que, por sua vez, é abastecido pela represa do Guarapiranga (CHANNEL, 2017).

A população de Taboão da Serra é estimada em 227.343 habitantes e a capitação do esgoto vai para a estação de tratamento no município de Barueri (SABESP, Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - SABESP, 2016).

O outro município incluído neste estudo foi o de São Lourenço da Serra que abriga a nascente do rio São Lourenço, e seu território está integralmente inserido na Área de Preservação dos Mananciais. O rio São Lourenço situa-se na região do Vale do Ribeira e está classificado como corpo d'água Classe 2, uma vez que fornece água potável para consumo após tratamento convencional, além de servir para recreação e preservação da vida aquática. O rio São Lourenço da Serra desemboca na represa Cachoeira do França onde será implantado o novo sistema de captação de água para o abastecimento da população (PREFEITURA DE SÃO LOURENÇO DA SERRA, 2011).

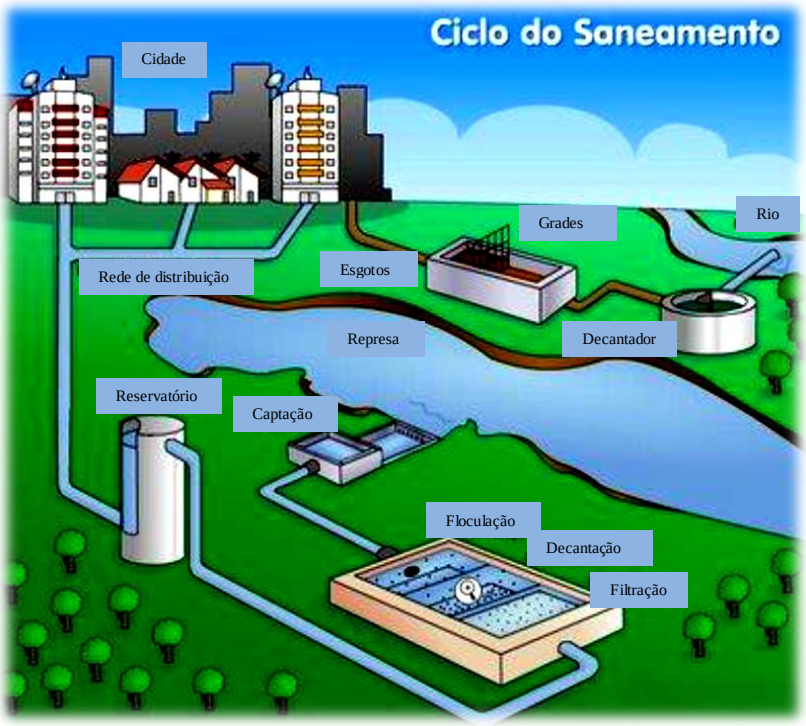
Os sistemas de esgoto de uma cidade são importantes porque a água de abastecimento utilizada pela população gera esgoto doméstico e não doméstico, que ao deixar os imóveis passam pelas redes coletoras de esgoto, e através de coletores troncos são transportados até chegar às Estações de Tratamento de Esgotos (ETEs). Esses coletores são estruturas físicas que podem conter estações de bombeamento, buracos e canais (tubulações). O efluente final é devolvido aos corpos d'água atendendo os parâmetros da legislação vigente.

O esgoto da cidade de São Lourenço da Serra, em particular, é transportado para a ETE onde passa pelas lagoas de estabilização e, após passar por tratamento em tanque de cloração, é finalmente liberado no rio São Lourenço da Serra (PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO, 2015).

A importância da gestão da água residuária é evitar o contato direto das populações urbanas com o material fecal e potenciais agentes patogênicos microbianos reduzindo, assim, a propagação de doenças. No entanto, a passagem da água residuária pelas tubulações, pode propiciar a formação de biofilmes microbianos e os micro-organismos desses biofilmes, na ausência de oxigênio, pode favorecer o acúmulo de sulfito (H_2S) e metano (CH_4) como produtos finais de diferentes metabolismos microbianos. Como consequência, a utilização de matéria orgânica por bactérias redutoras de sulfato (SRB) e por Archaea metanogênicas podem causar a corrosão das tubulações dos esgotos (AUGUET; MONTANIÉ; HARTMANN, 2009).

A figura 1 demonstra a captação da água bruta no manancial que é conduzida para as ETAs, onde é realizado o tratamento de acordo com os padrões de qualidade, regulamentado pela Portaria 2914/11. Em seguida, esta água tratada vai para a cidade sendo consumida e utilizada pela população, gerando água residuária. O esgoto, por sua vez, através das tubulações, vai para as ETEs onde é tratado e, por último, como destino final, é lançado nos rios.

Figura 1- O ciclo de saneamento de água



Fonte: Sabesp (2016).

1.2 Represas

As águas de rios, lagos, reservatórios artificiais, córregos são classificadas como m**anancial superficial**. Embora exista também nesta classificação o **manancial subterrâneo** que é aquele que se encontra totalmente abaixo da superfície terrestre, compreendendo os lençóis freático e profundo e a **água meteórica** que é a água existente na natureza na forma de chuva, neve ou granizo (HELLER; PADUA, 2006).

As represas ou reservatórios são classificadas como sendo ecossistemas artificiais, construídas pelo homem. Esses locais são ambientes intermediários ou híbridos, já que eles se originam de transformações de rios em lagos (NISHIMURA, 2012).

As represas estão sujeitas a ação climática do local onde elas estão localizadas como, por exemplo, a precipitação, vento e radiação solar. Elas também estão sujeitas a circulação de corrente de água oriunda do sistema operacional de barragem, o qual pode ser horizontal ou vertical, dependendo da necessidade do sistema de operação dessas barragens (MORO et al., 2003).

Inicialmente os reservatórios brasileiros foram projetados longe da população e em lugares cuja vegetação ao seu redor era mais conservada. Eles foram construídos inicialmente com a finalidade de geração de energia elétrica, porém, atualmente são utilizados para diversos fins como recreação, abastecimento de água, navegação, fins paisagísticos e controle de inundações (NISHIMURA, 2012).

No entanto, os reservatórios situam-se próximos às regiões desmatadas, residenciais e de grandes centros urbanos brasileiros e, com isso, sofrem forte influência de descarga de nutrientes, como matéria orgânica, sedimentação natural e, consequentemente, a crescente degeneração da qualidade das águas dos mananciais superficiais e subterrâneos (HENRY et al., 2008; RODRIGUES, 2008). Essa degradação do ambiente ao redor dos reservatórios é provocada pelo crescimento desordenado da maioria dos grandes centros urbanos brasileiros e consequente ocupação indevida das áreas de proteção de mananciais (PEREZ, 2008).

Este fenômeno de desequilíbrio ecológico pode provocar alterações nos fatores químicos e físicos da água como, por exemplo, a precipitação de íons fosfato, ferro, alumínio, sulfeto, de compostos orgânicos e carbonatos, provocando a eutrofização ou enriquecimento das águas. A eutrofização pode acarretar vários problemas no ambiente aquático, tais como: proliferação rápida de algas e cianobactérias, flutuações da concentração de oxigênio dissolvido e diminuição ou aumento excessivo do pH, dependendo dos produtos que estão sendo lançados nessa água (BESSA, 2007).

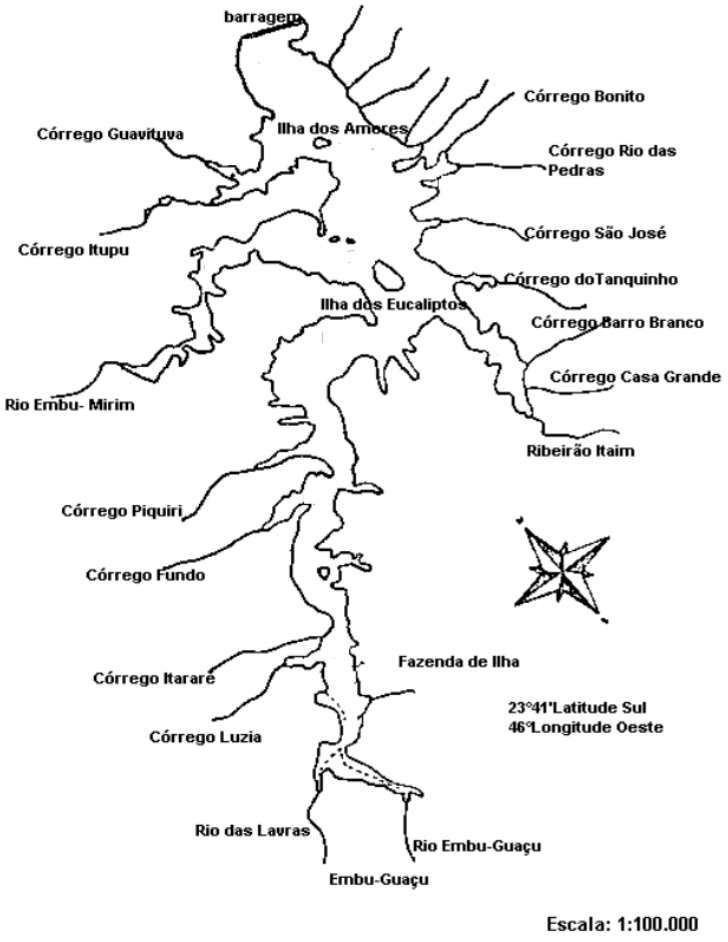
Vários problemas podem ser desencadeados pela eutrofização das águas como a toxicidade causada pelas cianotoxinas, tais como lesões no fígado e produção de tumores, em situações de exposição prolongada de microcistina, ou ainda através de ingestão de água contaminada. As microcistinas são capazes de permanecer por meses no meio líquido e pode persistir na água tempo suficiente para passar pelos sistemas de captação, tratamento, armazenamento e distribuição, representando assim, risco de intoxicação associada ao abastecimento público de água potável, caso não seja conferido tratamento apropriado para remoção dessa toxina (PEREZ, 2008).

Um reservatório importante em São Paulo é a represa Guarapiranga que possui a forma do tipo dendrítica, estreita e alongada. Localiza-se a 23º 43’ S e 46º 32’W, numa altitude de 742 metros, com 5,7 metros de profundidade média. Possui um volume aproximado de 194 milhões de metros cúbicos de água e uma área de ocupação com 640 km^2, na região sudoeste da Grande São Paulo. É uma sub-bacia do Alto Tietê e liga-se a esta sub-bacia através do canal do rio Pinheiros (NISHIMURA, 2012; RODRIGUES, 2008; TUCCI, SAWATANI; LOPES, 2005).

Essa represa abastece os municípios de Embu-Guaçu e Itapecerica da Serra e parte dos municípios de Cotia, Embu, Juquitiba, São Lourenço da Serra e São Paulo. Atualmente, a represa Guarapiranga constitui o segundo maior manancial do sistema de abastecimento da região Metropolitana de São Paulo. Ela é alimentada por outras duas bacias hidrográficas: a primeira, e mais antiga, a reversão do rio Capivari para o rio Embu-Guaçu (NISHIMURA, 2012; SABESP, 2013). Já a segunda, é a reversão das águas do braço Taquacetuba, da represa Billings para a Guarapiranga. Seus principais contribuintes são os rios Embu-Guaçu, Embu-Mirim, Lavras e Parelheiros, além de vários córregos como mostra a figura 2 (RODRIGUES, 2008).

No Brasil, o uso mais comum do manancial é para fins de abastecimento público, no entanto, de acordo com Galizia (2016), por causa da má administração na área ambiental, descaso de autoridades municipais, o custo para o tratamento desses mananciais está cada vez mais alto e longe de ser resolvido.

Figura 2. Mapa representando os córregos que fazem parte do Reservatório Guarapiranga.



Fonte: Cutolo (1993).

1.3 Eutrofização

A eutrofização é um processo de enriquecimento de corpo d'água lêntico, principalmente pelos nutrientes como nitrogênio (N) e fósforo (P). Este enriquecimento provoca alteração ambiental, acarretando a água a precipitação dos íons ferro, alumínio, sulfeto, compostos orgânicos e carbonatos, alteração de pH nas condições de oxi-redução, altas concentrações de amônia que podem ser tóxicas e causar câncer em animais aquáticos e no homem já que as fontes artificiais mais importantes desses íons são os esgotos domésticos e industriais, fertilizantes agrícolas e material particulado de origem industrial contido na atmosfera (SILVA, 2008).

Este processo tornou-se um dos principais problemas ambientais em todo o mundo, já que ele provoca a proliferação de algas e plantas aderidas que, ao entrarem em decomposição,

produz a liberação de nutrientes como o fósforo e o nitrogênio que, por sua vez, atuam como desencadeadores do processo de eutrofização estimulando a produção primária do meio aquático. As principais alterações provocadas na água são: altos déficits de oxigênio dissolvido (principalmente no período da noite, quando a fotossíntese não ocorre); produção de gases, tais como metano, carbônico e sulfídrico, gerando ambiente tóxico e prejudicial à sobrevivência de peixes e outros animais aeróbios ocasionando a perda da biodiversidade, já que só sobrevivem aqueles organismos que são resistentes a ambientes degradados; florações de vários gêneros e espécies de cianobactérias que são potencialmente produtoras de toxinas (hepatotóxicas, citotóxicas e neurototóxicas), as quais podem afetar seriamente a saúde humana e provocar decréscimo das populações de animais silvestres (DEZOTTI, 2008).

O processo de eutrofização na natureza pode ocorrer de dois modos: o primeiro modo é chamado de eutrofização natural e o segundo modo de eutrofização artificial (RODRIGUES, 2008).

A eutrofização natural pode levar milhares de anos para ocorrer, pois é um processo lento, já que a quantidade de nutrientes lançada na água é baixa. Este processo ocorre num ambiente onde a natureza é preservada, ou seja, onde ainda existe a mata ciliar em volta do corpo d'água e, consequentemente, a maior parte dos nutrientes liberado no solo pela decomposição de plantas mortas voltam para esses vegetais através da absorção pelas raízes. Com a ação das chuvas, os nutrientes diluídos são carregados para o corpo d'água mais próximo. Além disso, a pequena quantidade de nutriente que chega aos corpos d´água pode ser benéfica para o ambiente aquático, pois aumenta a produtividade do sistema, consequentemente, a capacidade de manutenção da vida aquática (RODRIGUES, 2008; ROVERI, 2011).

Por outro lado, a eutrofização artificial é provocada pelo homem, cuja ação pode liberar excesso de nutrientes na água dos rios e lagos ocasionando, por conseguinte, a poluição desses ambientes. A eutrofização artificial pode levar alguns anos para acontecer, tornando a água imprópria para o consumo e sobrevivência de seres vivos que dependem de uma água mais pura (RODRIGUES, 2008). Esse processo provoca a elevação nos custos de tratamento para fins de abastecimento, entupimento de filtros e tubulações. Além desses problemas, ocorre o crescimento das macrófitas enraizadas podendo interferir na navegação, aeração e capacidade de transporte do corpo d'água. Em decorrência da eutrofização e do assoreamento de um lago, aumenta-se o acúmulo de vegetação de tal forma que o lago pode se tornar cada vez mais raso, até vir a desaparecer (DEZOTTI, 2008).

Além destas características o excesso de nutrientes como a amônia, metais tais como o ferro, manganês, zinco, selênio, em altas concentrações podem ser tóxicos, afetando todas as formas de vida, desde as bactérias até os seres humanos já que a presença em baixas concentrações é essencial para o crescimento dos organismos, porém (SILVA, 2008). A toxicidades dessas substâncias podem ser agravada com o aumento do pH do local que por sua vez é provoca pela presença de substâncias lançadas na água que sejam alcalinas como o zinco, potassio, sódio (ZOPPAS, 2012).

Muito embora a presença de nutrientes como a amônia e metais pesados tais como o ferro, manganês, zinco, selênio e cádmio em baixas concentrações sejam essenciais para o crescimento dos organismos, em altas concentrações, como no caso da eutrofização, podem ser tóxicos, afetando todas as formas de vida, desde as bactérias até os seres humanos (SILVA, 2008). A toxicidade dessas substâncias pode ser ainda agravada com o aumento de pH da água que, por sua vez, é provocado pela presença de substâncias alcalinas como o zinco, potassio e sódio (ZOPPAS, 2012).

O fósforo, por sua vez, tem importância fundamental para os micro-organismos porque ele participa ativamente em processos como armazenamento de energia (na molécula de adenosina trifosfato, ATP), na estruturação da membrana celular (fosfolipídica), na transferência da informação genética (componente dos ácidos nucleicos, DNA e RNA), e no metabolismo celular (componente de várias enzimas e vitaminas) (ESTEVES; PANOSSO, 2011).

O excesso de nitrato na água é prejudicial para a saúde porque essa substância pode ser reduzida em ácido nitrico que, por sua vez, tem afinidade com as hemoglobinas do sangue, podendo causar a meta-hemoglocinemia em recém-nascidos e em adultos. A hemoglobina, por sua vez, ligada ao ácido nitrico é incapaz de fixar o oxigênio e, conseguentemente, transportá-lo e desponibilizá-lo na célula. Do mesmo modo, a quantidade de nitrito deve ser controlado na água porque seu consumo pode provocar a formação de nitrosaminas carcinogênicas, pela sua reação com aminas secundárias presentes no estômago de mamíferos (ZOPPAS, 2012).

1.4 Plâncton no ambiente aquático

A palavra plâncton é de origem grega, que significa “errante ao sabor das ondas", é constituído por organismos aquáticos (animais e vegetais), que vivem em suspensão na coluna d'água e não possuem movimentos próprios capazes de vencer a corrente aquática. Esses

organismos podem ter todo o seu ciclo de vida como planctônicos (holoplâncton) ou viver temporariamente no ambiente aquático como os ovos e larvas de peixes (meroplanctônicos) (RODRIGUES, 2008).

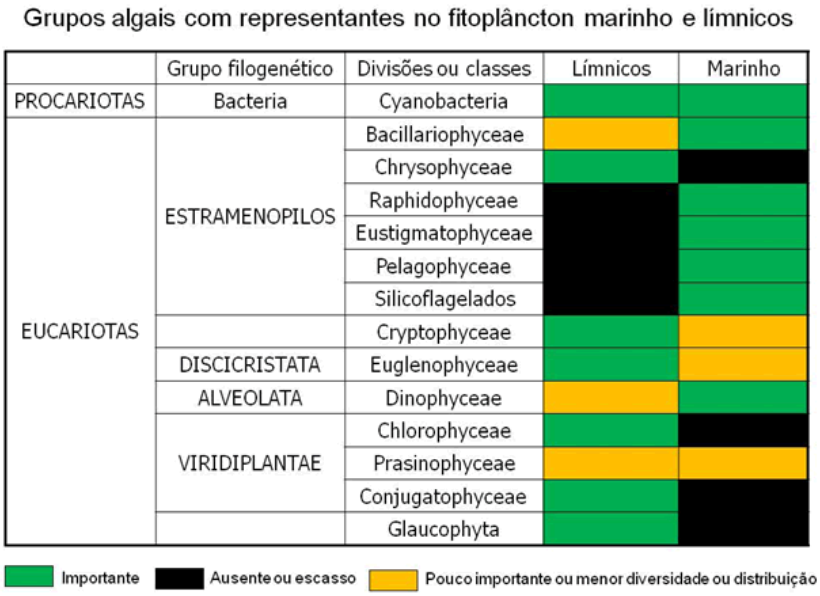
A comunidade planctônica é composta basicamente pelo zooplâncton (microcrustáceos, micromoluscos e outros metazoários predadores), protozooplâncton (protozoários), fitoplâncton (microalgas), micoplâncton (fungos), bacterioplâncton (bactéria) e virioplâncton (vírus) (NISHIMURA, 2012; RODRIGUES, 2008).

O plâncton é classificado de acordo com suas dimensões. **Fentoplâncton**: entre 0,02 a 0,2 micrômetro (µm) (viroplâncton); **picoplâncton**: entre 0,2 a 2 µm (bacterioplâncton); **nanoplâncton**: de 2 a 20 µm (protozooplâncton, micoplâncton e microalgas menores); **microplâncton**: de 20 a 200 µm (protozooplâncton); **mesoplâncton**: entre 200 µm e 2 cm (algumas algas, protozooplâncton e metazooplâncton); **macroplâncton**: 2 a 20 cm (algas, protozooplâncton e metazooplâncton); **megaloplâncton**: > 20 cm. (metazooplâncton) (CARON et al., 1995).

O plâncton é constituído de seres marinhos ou de estuários (talassoplâncton) e também ser de águas continentais (limnoplâncton) (CARON, DAM, et al., 1995).

Os principais representantes do plâncton continental são: Cyanophyta (cianobactérias), Chlorophyta (algas verdes), Charophyta, Euglenophyta, Heterokonta (diatomáceas, crisofíceas e xantofíceas), Chryptophyta e dinoflagelados (ESTEVES; SUZUKI, 2011) (figura 3).

Figura 3- Quadro demonstrativo das algas presentes na água doce (Límnicos) e no ambiente marinho (Marinho).



Fonte: Nishimura; Carlos (2016).

Dentre os organismos planctônicos, existe o perifiton, que pode ser definido como uma comunidade complexa de algas, bactérias, fungos, protozoários e animais, além de detritos aderidos a substratos submersos orgânicos ou inorgânicos, vivos ou mortos. Esses organismos são responsáveis por "sequestrar" nutrientes (N e P) e, portanto, são fonte de alimento para inúmeros invertebrados e peixes e considerados como um dos principais produtores primários nos ecossistemas aquáticos continentais tropicais, principalmente em ambientes rasos como córregos, riachos e lagoas costeiras, contribuindo com cerca de 70 a 85% da produção primária total. São importante fonte de matéria orgânica autóctone, sendo o principal local de depósito de carbono orgânico, além de ter importante papel na mineralização da matéria orgânica dissolvida e na ciclagem de nutrientes (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

Os micro-organismos como algas, fungos, bactérias e vírus estão presentes em todos os ecossistemas, tanto aquáticos quanto terrestres, participando de várias relações ecológicas. A importância desses organismos se dá principalmente pela interação deles com o meio ambiente. O fitoplâncton são produtores primários, já as bactérias e vírus, por exemplo, interagem com animais, plantas e outros organismos, podendo ou não parasitá-los ou, ainda, conviver em mutualismos (FERNANDES; ESTEVES, 2011).

1.4.1 Fitoplâncton no ambiente

Fitoplâncton se refere ao coletivo de micro-organismos que, na sua maioria, são fotossintetizantes e adaptados a viver flutuando na massa d’água, principalmente na zona eufótica (região com grande exposição ao sol) (NISHIMURA, 2012; RODRIGUES, 2008).

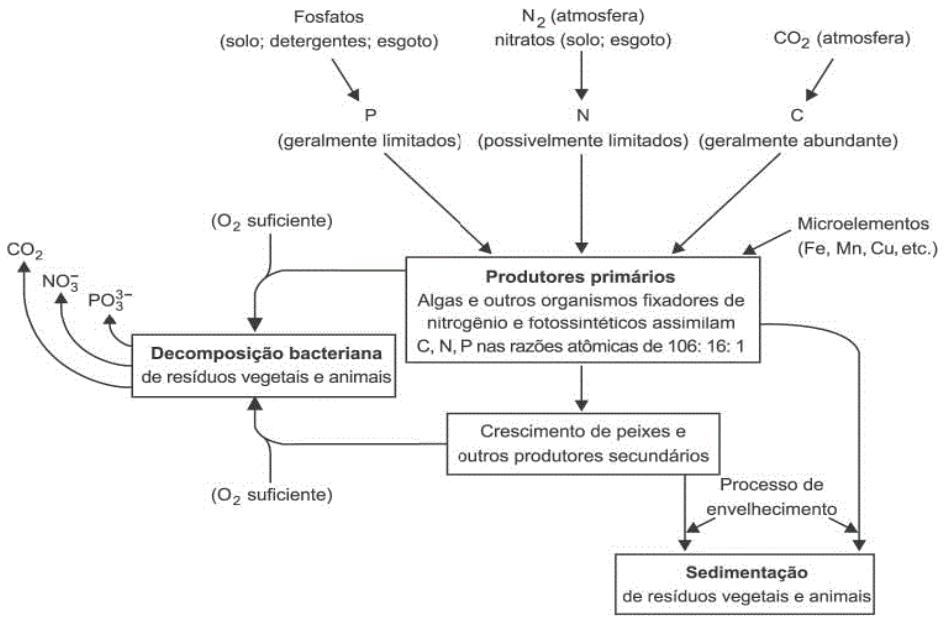
Esses micro-organismos são caracterizados por possuírem uma grande diversidade filogenética, por terem tamanhos e formas variadas e pelas diferentes estratégias adaptativas. São capazes de sintetizar a matéria orgânica através da fotossíntese e constituem a base da cadeia alimentar dos ambientes aquáticos. Além disso, também respondem rapidamente as mudanças que ocorrem no meio aquático (NISHIMURA, 2012; RODRIGUES, 2008; RONQUI, 2008).

Devido a essas várias características, o fitoplâncton são usados como indicadores ecológicos e também auxiliam no entendimento das inter-relações de fatores físicos (temperatura e circulação), fatores químicos (nutrientes e distribuição relativa dos íons

dissolvidos na água) e fatores biológicos (interação das espécies, efeitos da predação e parasitismo) (NISHIMURA, 2012; RODRIGUES, 2008).

Estão envolvidos nos ciclos biogeoquímicos globais e também são responsáveis pela fixação e pela regeneração dos principais constituintes orgânicos celulares (carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo) (figura 4) (RONQUI, 2008). Os ciclos biogeoquímicos ocorrem com mais intensidade na zona de transição, principalmente entre a coluna de água e a parte profunda do lago, rio ou do mar. Nesse local ocorre um aumento dos níveis de nutrientes e de densidade de micro-organismos presentes e, por conseguinte, aumento da ciclagem de nutrientes como carbono, enxofre e nitrogênio (GALINARI, 2011).

Figura 4- Dinâmica dos nutrientes em um lago



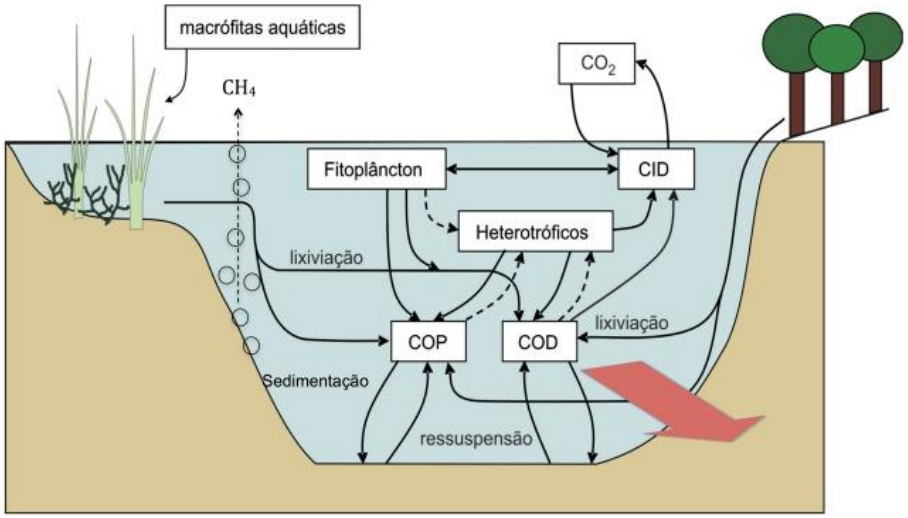
Fonte: ENEM (2011).

As fontes de carbono dissolvido (COD) e carbono particulado (COP) para os ecossistemas aquáticos podem ser internas (autóctones) ou externas (alóctones) ao ecossistema. As principais fontes de COD e COP autóctones são o fitoplâncton, o perifíton e as macrófitas aquáticas. As fontes COD e COP alóctones para um ecossistema aquático contintental podem ser os aquíferos e lençois freáticos e, até mesmo, uma possível sedimentação de carbono orgânico presente na atmosfera. (ESTEVES et al., 2011). No ambiente aquático, o fitoplâncton é o produtor primário dominante, no entanto, em fontes hidrotermais, na preseça de compostos hidrocarbônicos e sulfurosos, as bactérias são capazes

de fixar o carbono inorgânico, representando a principal fonte de matéria orgânica para os organismos que vivem nesses ambientes (SOARES-GOMES; FIGUEIREDO, 2002).

O fitoplâncton presente na água doce, ajudam no consumo do dióxido de carbono (CO_2), impedindo que o CO_2 na água provoque a acidificação do local e também participa na liberação para a atmosfera, como observado na figura 5. Desta forma, estes micro-organismos são cruciais para o ciclo global do carbono.

Figura 5- Transformações do carbono em corpos d'água continentais.



Fonte: Esteves et al. (2011). (setas cheias) Indicam transformações do carbono, (setas tracejadas) indicam fluxo na cadeia trófica, (seta vermelha) indica o fluxo de água e materiais para jusante do ambiente (sejam rios ou lagos de inundação), (CID) significa carbono inorgânico dissolvido.

1.4.2 Bacterioplâncton

O bacterioplâncton é composto pelas comunidades bacterianas de hábito planctônico. São organismos que geralmente encontram-se na ordem de 10^6 a 10^{10} células mL^{-1} e podem medir de 0,2 a 0,5 µm, no entanto, já foram observados indivíduos de até 100 µm quando se desenvolvem aderidas a superfícies ou ao sedimento (THOMAZ, 1999). Dentre as importantes funções ecológicas deste grupo, destacam-se a transferência de energia e matéria entre o meio abiótico e os níveis tróficos superiores das cadeias alimentares, como também, à ciclagem e mineralização do carbono (figura 2), do nitrogênio e do fósforo (ESTEVES, 2011; RONQUI, 2008).

As bactérias estão representadas em praticamente todos os grupos fisiológicos (autotróficos, heterotróficos, aeróbios e anaeróbios) e atuam nos principais processos de transformação do nitrogênio (amoninificação, nitrificação, redução do nitrato, desnitrificação e amonificação do nitrito) (ESTEVES; AMADO, 2011).

No bacterioplâncton existem dois grupos ecofisiológicos: **planctobactéria,** constituído pelas bactérias de vida livre que possuem tamanhos <1 µm, sendo normalmente gram negativas, e o grupo de e**pibactérias,** cujos constituintes são bactérias que crescem aderidas a partículas e/ou colonizam sedimentos aquáticos, podendo ser gram negativas ou gram positivas. São representadas por bactérias decompositoras, mutualistas e parasitas (LUO; MORAN, 2015).

As bactérias de vida livre (planctobactéria) podem existir em qualquer lugar do planeta, como solo, água, lugares extremos, geralmente vivem sozinhas (LUO; MORAN, 2015). No entanto, as bactérias heterotróficas parasitas (epibactérias) são aquelas que conseguem o seu alimento a partir de seres vivos, muitas vezes provocando doenças. Estes micro-organismos podem colonizar seres humanos, aves, peixes, algas, etc. (LUO; MORAN, 2015).

Bactérias heterotróficas simbiontes são bactérias que fazem parte do grupo das epibactérias e são associadas a outros seres vivos e não lhes causam doenças e, muitas vezes, ajudam o hospedeiro como, por exemplo, as bactérias simbiontes de esponjas do mar, de poliquetas, de seres humanos e de animais (LUO; MORAN, 2015).

As bactérias heterotróficas saprófitas ou decompositoras também pertecem ao grupo das epibactérias e, assim como os fungos, conseguem alimento a partir da decomposição de matéria orgânica. Esses micro-organismos atacam cadáveres de animais, plantas e outros tipos de matéria orgânica, decompondo-os. A partir dessa decomposição, essas bactérias, além de obterem energia, ainda contribuem para a ciclagem de nutrientes na natureza (THOMAZ, 1999).

As bactérias heterotróficas tem um papel relevante nos ambientes aquáticos, apesar de dependerem da matéria orgânica sintetizada por outros organismos para seu desenvolvimento como fonte de energia e de carbono, são capazes de oxidar matérias orgânicas e consumirem toda a carga poluidora que é lançada nestes corpos de água (processo de decomposição), sendo assim, são as principais responsáveis pela autodepuração (HISATUGO, 2012; THOMAZ, 1999). Além disso, representam um importante grupo de organismos fixadores de nitrogênio, principalmente no sedimento e no perifíto heterotrófico, podendo contribuir

significativamente para a fixação global de nitrogênio de ecossistemas aquáticos continentais, lagos tropicais oligotróficos e heterotróficos (ESTEVES; AMADO, 2011).

Além da classificação ecofisiológica as bactérias podem ser classificadas como autotróficas, sendo denominadas de fotoautotróficas (fotolitotróficas), quando estas bactérias utilizam a luz como fonte de energia e o carbono inorgânico (CO_2) como fonte de carbono. As representantes deste grupo são as bactérias fotossintetizantes (Cyanobacteria), bactérias sulfurosas púrpuras (*Chromatium*), bactérias sulfurosas verdes (*Chlorobium*), algas e plantas verdes (HISATUGO, 2012; THOMAZ, 1999).

Quando utilizam os compostos químicos inorgânicos podem ser denominadas quimioautotróficas (quimiolitotróficas) e tem papel fundamental, pois são capazes de oxidar substâncias inorgânicas, disponibilizando e transferindo nitrogênio, enxofre e outros elementos, além de formar água (CRAPEZ, 2002). Como exemplo, podemos citar as bactérias *Thiobacillus thiooxidans*, *Nitrobacter*, *Hydrogenomonas* e *Thiobacillus ferrooxidans* que usam como substrato o enxofre, amônia, hidrogênio e ferro, respectivamente (HISATUGO, 2012; THOMAZ, 1999).

Dentro deste grupo fazem parte as espécies fotoheterotróficas (fotorganotróficas) os quais utilizam luz como fonte de energia e compostos orgânicos (álcool, carboidratos, ácidos orgânicos, etc.) como fonte de carbono. São representadas pela bactérias verdes não sulfurosas (*Chloroflexus*) e pelas bactérias púrpuras não sulfurosas (Rhodopseudomonas) (HISATUGO, 2012).

E as quimioheterotróficas (quimiorganotróficas), são micro-organismos que obtém energia utilizando a matéria orgânica ou compostos orgânicos como fonte de carbono para seu crescimento e para a síntese de seu material celular (HISATUGO, 2012). Elas podem ser aeróbias ou anaeróbias e também são capazes de oxidar substâncias biogênicas e antropogênicas liberando produtos orgânicos (CRAPEZ, 2002).

Devido à atividade decompositora tanto as bactérias como os fungos já eram vistos como responsáveis pela decomposição da matéria orgânica em gás carbônico e outras substâncias simples, assumindo um papel no retorno de nutrientes aos ecossistemas terrestres e aquáticos em uma cadeia alimentar linear (CRAPEZ, 2002).

Hoje, no entanto, sabe-se que as bactérias, além da função de decompositores, são importantes agentes transformadores da matéria orgânica dissolvida (MOD) em matéria orgânica particulada (MOP), fazendo com que o carbono dissolvido, na forma inacessível aos organismos heterotróficos, fosse reincorporado nas redes alimentares na forma particulada. Portanto, são fonte de energia para os ecossistemas aquáticos já que esses micro-organismos

reintroduzem o carbono nas teias alimentares tornando-se parte do elo microbiano ou alça microbiana (*microbial loop*) (HISATUGO, 2012; THOMAZ, 1999).

A MOD é a forma coletiva de denominar a matéria de origem biológica, formada fundamentalmente pela excreção e exsudação de animais, plantas e micro-organismos. Tais formas dissolvidas de matéria orgânica não podem ser diretamente consumidas pela grande maioria dos organismos aquáticos. A MOD é formado por compostos químicos refratários, principalmente ácido húmicos e fúlvicos, proteínas, aminoácidos, lipídeos e carboidratos, ou seja, formada primariamente de carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo e enxofre (ESTEVES; CALIMAN, 2011).

A MOP contudo envolve sedimentos de origem biológica, flocos amorfos de materiais orgânicos e até organismos marinhos de pequeno tamanho, frações de tamanho maior que 0,22 µm, incluindo células vivas, como bactérias e constituintes do fitoplâncton (ESTEVES; CALIMAN, 2011).

O conceito de *loop* microbiano, que utilizamos hoje foi proposto em 1983 por Azam, e somente na década de 90, os vírus foram incluídos neste processo. A alça microbiana é constituida pela interação das bactérias que são capazes de utilizar de 10 a 50 % do carbono produzido através de atividade fotossintética. Esta, por sua vez, é consumida pelos flagelados heterotróficos nanoplanctônicos e estes flagelados são por sua vez predados por organismos zooplanctônicos intervindo deste modo ativamente nas cadeias tróficas (figuras 2 e 3) (HISATUGO, 2012; THOMAZ, 1999).

Em resumo a interação entre os fitoplâncton, zooplâncton, peixe, fontes externas (floresta) ou internas (macrófitas aquáticas) ajudam o ecossistema aquático liberando o COD que, por sua vez, é incorporado pelas bactérias planctônicas e, por conseguinte, podem ser predadas pelo microzooplâncton (flagelados e ciliados que, da mesma forma, são consumidos pelo macrozooplâncton). Como consequência, a MOD retorna para a cadeia alimentar sem precisar passar pelas etapas de decomposição e mineralização (FARJALLA, AMADO; ESTEVES, 2011).

1.4.3 Archaea

A Archaea pertence a um dos três domínios da vida. É um grupo altamente diversificado e abundante de procariotas e inclui uma série de extremófilos que crescem e se multiplicam em ambientes extremos, como fontes termais, lagos salgados e *habitats*

vulcânicos. No entanto, sabe-se que a Archaea assim como as bactérias, são geralmente mesófilas (ECKBURG; LEPP; RELMAN, 2003).

Eram tradicionalmente vistas como extremófilos, ou seja, organismos que só sobrevivem em altas temperaturas, alto teor salino, ou ambientes anaeróbicos extremos, e incapazes de competir com outros micro-organismos para adquirirem nutrientes sob condições "não extremas". No entanto, as populações de Archaea planctônicas são mesófilas e compõem uma grande porcentagem das comunidades microbianas dos oceanos, chega a 60 % do total dos procariontes encontrados nos oceanos e, ainda, fazem parte da ciclagem de carbono e nutriente das águas costeiras e oceânicas.

Embora, a fisiologia básica e a contribuição de Archaea sejam reconhecidas, o real papel dessa comunidade microbiana ainda permanece desconhecido (OUVERNEY; FUHRMAN, 2000). Archaea foram detectadas em todos os ambientes estudados após sequenciamento gênico, mas a sua ecologia nestes ambientes é praticamente desconhecido, como o seu na condução de ciclos biogeoquímicos (CAVICCHIOLI, 2011; HERNDL et al., 2005).

Algumas propriedades que as Archaea possuem são semelhantes ao domínio Bacteria, como a morfologia e a presença de um cromossomo circular. No entanto, a replicação do DNA, a transcrição de RNA, a tradução de proteínas e a presença de histonas para o empacotamento do DNA cromossômico, assemelham-se ao domínio Eukaryota. Outras características, contudo, são únicas para esse domínio. Mais da metade dos genes de Archaea são capazes de codificar proteínas com funções desconhecidas. As populações de Archaea são ativas na captação de aminoácidos dissolvidos, são heterotróficas e também parecem coexistir com bactérias no mesmo ambiente (OUVERNEY; FUHRMAN, 2000). Além disso, é desprovida de peptidoglicano na parede celular, sua membrana celular é formada por lipídeos ligados a cadeias de ésteres de L-glicerol, em vez de ésteres D-glicerol ou ácidos graxos, e não possuem mureína nas paredes celulares (GACI et al., 2014).

Quanto ao metabolismo podem ser quimioheterotróficas e capazes de se associarem às substâncias dissolvidas (MOD ou nutrientes inorgânicos) e normalmente são liberadas para o plâncton, onde crescem lentamente (OUVERNEY; FUHRMAN, 2000).

Existem cerca de 527 espécies de Archaea classificadas pela base de dados de taxonomia NCBI, ou mais de 4.500 espécies, se não forem incluídas espécies não cultivadas e não especificadas (GARCIA-VALLVE; ROMEU, 2000).

As dimensões dos representantes de Archaea variam de 0,1 μm até 15 μm de diâmetro, e, quanto à morfologia, são normalmente esféricos, em forma de bastões, espirais ou placas.

São classificados nos filos **Crenarchaeota,** que são termoacidófilos, ou seja, vivem em fontes termais ácidas, fendas vulcânicas ou profundezas oceânicas, no filo **Euryarchaeota,** que incluem metano-produtores (metanogênicas), são anaeróbias estritas, vivem em pântanos e em tubo digestivo de herbívoros e cupins onde produzem o gás metano. Nesse grupo, ocorrem as halófitas que são as que habitam águas com alto teor de salinidade e são capazes de produzir energia a partir da luz e, por último, filo **Korarchaeota**: foram encontrados em fontes hidrotermais de alta temperatura do Parque Yellowstone (Estados Unidos da América - EUA)

Além desses filos, em 2008, foi proposto a criação de um outro filo chamado **Thaumarchaeota,** cujos membros foram encontrados na pele humana e que se caracteriza por oxidar amônia (LURIE-WEINBERGER; GOPHNA, 2015; PESTER; SCHLEPER; WAGNER, 2011).

Archaea habitam o corpo humano através de relacionamentos simbióticos e comensais com o hospedeiro. Dois tipos de Archaea podem entrar em contato com os seres humanos, Archaea halófilicas, que comumente são encontradas em alimentos com alto teor de sal, como salsichas, porco salgado e peixe, e Archaea metanogênicas, que são encontradas no intestino e nos dentes (ECKBURG; LEPP; RELMAN, 2003).

As metanogênicas também são encontradas em ambientes marinhos e de água doce, são responsáveis pela produção do metano (CH_4), que é o último estágio da decomposição do carbono em vários ambientes anaeróbicos, tais como, trato gastrointestinal de animais, solos e sedimentos. Nos tratos gastrointestinais de animais, onde elas podem participar da conversão de matéria orgânica, utilizando os produtos metabólicos produzidos pelas bactérias (CO_2, H_2 e acetato) e outros compostos como ametilaminas e o metanol e os convertem em metano (CH_4). Desta forma, a metanogênese pode ser considerada um dos mais importantes processos de degradação da matéria orgânica em sedimentos anóxicos (CAVICCHIOLI, 2011; ESTEVES et al., 2011).

Este micro-organismo consome cerca de 90 % do metano (CH_4) produzido, agindo como um filtro, permitindo assim que 10 % do CH_4 produzido no sedimento seja transferido para a coluna d'água. A oxidação do CH_4, na presença de oxigênio, pode ser feita através da ação de bactérias metanotróficas (ESTEVES et al., 2011).

Archaea, quando estão num ambiente sem oxigênio, podem utilizar dióxido de carbono, acetato e compostos que contenham o grupos metilo para a sua metanogênese. O metano é encontrado em ambiente anóxicos, tais como os arrozais, zonas húmidas, aterros sanitários e no estomago de ruminantes (NARIHIRO; SEKIGUCHI, 2011).

Estes micro-organismos são membros abundantes da microbiota dos animais e em seres humanos e podem ocorrer em grande quantidade no intestino grosso (cólon) de indivíduos saudáveis. A Archaea mais comum é a Metanogênica, possivelmente responsável no agravamento da obesidade, da magreza e da constipação. No entanto, hoje sabe-se que elas também podem remediar a toxidade do metanol, evitar o acúmulo de trimetilamina e prevenir doenças cardiovasculares (LURIE-WEINBERGER; GOPHNA, 2015).

Duas vias metabólicas ocorrem no intestino de seres humanos: a metanogênese e a redução do sulfato, que são vias mutuamente excludentes, de modo que apenas alguns indivíduos produzem metano e o liberam nas fezes, enquanto que outros não metanogênicos apresentam altos níveis de redução de sulfato nas fezes. A produção de metano pode estar relacionada com o desenvolvimento de doenças no intestino grosso, com constipação e síndrome do intestino irritável. Além disso, Archaea também são capazes de promover o crescimento de bactérias e assim causar a doença indiretamente no hospedeiro (BANG et al., 2014).

O metano é um gás inerte incolor, inodoro, volátil, que há muito tempo foi pensado que a sua produção não trazia efeitos nocivos nos seres humanos além, claro, do desconforto de distensão gasosa. No entanto, hoje essa ideia vem mudando porque o metano foi associado à varias doenças. Essa nova visão ainda não está muito clara se está ligada diretamente com a produção de metano ou se está ligado a remoção eficiente de hidrogênio do intestino, através da metanogênese, já que ao remover o gás hidrogênio, melhora a fermentação das bactérias (PIMENTEL et al., 2012).

Além da ação direta do metano em animais, ao ser liberado no ambiente, o metano pode colaborar com o efeito estufa, que ocorre quando os raios solares penetram efetivamente na atmosfera provocando, assim, o aquecimento global (ISGREN; MÅRTENSSON, 2013).

Mesmo não sendo encontrados genes de virulência em Archaea, acredita-se que esses micro-organismos tem o potencial para causar doenças, já que possuem acesso a um hospedeiro e capacidade de colonizá-lo, além disso, podem coexistir, a longo prazo, juntamente com a microbiota normal, multiplicando-se e enganando o sistema imunológico do hospedeiro (ECKBURG; LEPP; RELMAN, 2003).

1.4.4 Virioplâncton

O virioplâncton é o mais abundante e diverso componente do plâncton, sendo considerado um membro onipresente e ecologicamente importante das comunidades

aquáticas. Estima-se que 10^{30} vírus estão presentes nos oceanos do mundo todo, e eles podem ser encontrados na coluna de água superior, no sedimento marinho, nas fontes hidrotermais e em zonas únicas (PARSONS et al., 2012; PEREIRA et al., 2009; WILHELM; MATTESON, 2008).

Em relação à ampla maioria dos vírus presentes em estuários e em águas costeiras rasas, não foi observada variação na quantidade de vírus de acordo com a profundidade, no entanto, quando se trata especificamente de bacteriófagos, em alguns ambientes aquáticos, são encontradas altas taxas em regiões profundas, nos sedimentos marinhos e em ambientes dulcícolas (GALINARI, 2011). O virioplâncton ocorre mais na zona eufótica e a sua presença diminui exponencialmente de acordo com a profundidade do ambiente (PARSONS et al., 2012).

A flutuação da população viral tanto em ecossistemas marinhos como dulcícolas está correlacionada também com as estações do ano. Durante a primavera e o verão, há um aumento da população viral decaindo nos períodos de outono e inverno porque, durante o período da primavera, existe um aumento do fotoperíodo e da temperatura da água; isto resulta em maior atividade fotossintética, com liberação de carbono orgânico dissolvido favorecendo o crescimento bacteriano e, consequentemente, a proliferação viral (GALINARI, 2011).

Um estudo realizado no lagos Pavin e Aydat, na França, revelou que a concentração de vírus aumentou durante o período de estratificação térmica, registrando-se os valores mais altos no final do verão/outono e que essa dinâmica pode ser controlada pelas condições de luz. Além disso, também foi observada uma relação entre presença de vírus e presença de bactérias heterotróficas em toda a coluna de água no Lago Pavin, no entanto, apenas nas águas de fundo escuro no Lago Aydat. Em lagoas eutrofizadas o número de partículas virais é maior quando comparado a um ambiente oligotrófico, no qual a disponibilidade de recursos nutricionais é menor (JACQUET et al., 2010).

Embora muitos estudos já tenham sido realizados, como os citados acima, há ainda uma escassez de informações em relação aos aspectos da ecologia, da diversidade genética das espécies como também da diversidade de espécies presentes nos diferentes ecossistemas. Estudos tentam entender o papel dos vírus como agentes de mortalidade, como vírus patogênicos emergentes, a extensão das trocas de genes entre vírus e seus hospedeiros e, por último, como condutores dos elementos de ciclos biogeoquímicos, já que, apesar da abundância dos vírus no ambiente aquático, eles são difíceis de classificarem e avaliarem, especialmente no ambiente natural (CANTALUPO et al., 2011; ZHONG; JACQUET, 2014).

Outro fator relevante é que a grande maioria da diversidade viral não pode ser monitorada nem avaliada por abordagens moleculares convencionais, normalmente utilizadas para os grupos microbianos, nem tampouco pelas técnicas à base de cultura, já que os vírus não exibem um marcador filogenético conservado, tais como os genes de rRNA 16S, utilizados na classificação para bactérias, e o cultivo de muitos vírus não é possível em laboratório (RAY et al., 2012).

Além dos oceanos e rios, os vírus podem ser encontrados nos esgotos, que se tornaram um importante ponto de diversidade viral. Essas águas, que ainda não passaram por nenhum tratamento, contêm dejetos da população residente ao seu redor, são ricas em matéria orgânica e possibilitam, consequentemente, um ambiente favorável ao crescimento de espécies hospedeiras de vírus, como insetos, roedores, plantas, bem como micro-organismos procariotas e eucariotas (CANTALUPO; CALGUA; ZHAO, 2011). Com a possibilidade de replicação de vírus nesse ambiente, já que seus hospedeiros podem estar presentes, os vírus se tornaram motivo de especial preocupação para a saúde pública, pois podem persistir no meio ambiente e são resistentes a muitos processos de tratamento padrão da água (RAY et al., 2012).

Como os vírus parasitam provavelmente todos os membros de comunidades microbianas (protistas, microalgas e procariotas), tornam-se componentes importantes no ciclo microbiano aquático. Como consequência da lise viral, afetam os ciclos globais de carbono, aumentam a reciclagem de MOD, diminuem a transferência de carbono para níveis mais altos e alteram significativamente a estrutura das comunidades hospedeiras microbianas, já que são responsáveis por mudanças na diversidade genética da comunidade, assim como, pela lise de membros da comunidade abundante. Além disso, os vírus podem influenciar significativamente as concentrações de micronutrientes, como a presença de ferro na água, além de também estarem envolvidos diretamente nos ciclos biogeoquímicos (BENCH, 2007).

Dois tipos básicos de vírus são conhecidos, os que têm genoma de DNA e os que têm genoma de RNA (HOPKINS, 2017). De acordo com o sistema de classificação de Baltimore, os vírus são divididos em 7 classes: DNA de fita simples; DNA de fita dupla; DNA de fita dupla que replica o seu material genético gerando moléculas de RNA de fita simples de senso positivo intermediárias (por meio da ação da enzima transcriptase reversa); RNA de fita simples de senso positivo; RNA de fita simples de senso negativa; RNA de dupla fita e RNA de fita simples de senso positivo que replicam o seu material genético por meio de um processo denominado transcrição reversa (KOONIN; DOLJA; KRUPOVIC, 2015).

Atualmente estuda-se a possibilidade das infecções virais se tornarem mais prevalentes num futuro próximo por causa de novos vírus patogênicos que estão começando a emergir na população humana resultante da expansão desta população em áreas nativas, removendo as barreiras entre os vírus humanos dos vírus de animais e, consequentemente, aumentando possivelmente o desenvolvimento de zoonoses (SOBSEY; MESCHKE, 2003). Outros fatores como a globalização, provavelmente aumentou a incidência de vírus no mundo, já que os vírus viajam com os seus respectivos hospedeiros para diferentes partes do planeta e também as mudanças climáticas que, em alguns momentos, diminuíram os ciclos biológicos dos vetores, aumentando a incidência de certos vírus na população humana (FANCELLO; RAOULT; DESNUES, 2012).

1.4.4.1 Vírus de DNA

A maioria dos vírus de DNA pertence aos grupos I e II do sistema de classificação de Baltimore. Alguns vírus com genoma de DNA, como os vírus da família *Hepadnaviridae*, não estão incluídos nestes dois grupos porque estas famílias de vírus se replicam passando por um intermediário de RNA de cadeia simples, usando a transcriptase reversa e, portanto, foram incluídos no grupo VI (YUTIN; WOLF; KOONIN, 2014).

1.4.4.1.1 Vírus de dsDNA

Os vírus de DNA dupla fita (dsDNA), que são classificados no grupo I, são os vírus das ordens: Caudovirales e Herpesvirales. No entanto, dentro deste grupo, encontram-se algumas famílias cujas ordens ainda não foram definidas, como as famílias *Ascoviridae*, *Adenoviridae*, *Asfarviridae*, *Baculoviridae*, *Bicaudaviridae*, *Corticoviridae*, *Fuselloviridae*, *Globuloviridae*, *Guttaviridae*, *Iridoviridae*, *Lipothrixviridae*, *Mimiviridae*, *Nimaviridae*, *Papillomaviridae*, *Phycodnaviridae*, *Plasmaviridae*, *Polydnaviridae*, *Polyomaviridae*, *Poxviridae*, *Rudiviridae*, *Tectiviridae* (YUTIN; WOLF; KOONIN, 2014).

1.4.4.1.1.1 Classificação dos Caudovirales

Dentro do grupo I estão classificados os bacteriófagos, cujos membros da Ordem Caudovirales correspondem a 95% dos fagos presentes na natureza. Esta ordem possuem três famílias de fagos caudados, *Podoviridae*, *Siphoviridae* e *Myoviridae*. São fagos com genoma

DNA de fitas duplas lineares. Cerca de 60 % dos fagos com cauda longa e não contrátil pertencem à família *Siphoviridae*, 25 % dos fagos com cauda contrátil são da família *Myoviridae* e 6% são representados pelos fagos de cauda curta e não contrátil, família *Podoviridae* (MUNIESA; IMAMOVIC; JOFRE, 2011).

1.4.4.1.1.2 Classificação de famílias sem ordem definidas

Vírus que infectam somente Archaea pertencem às famílias *Ampullaviridae*, *Bicaudaviridae*, *Clavaviridae*, *Fuselloviridae*, *Globuloviridae*, *Guttaviridae*, *Lipothrixviridae*: *alpha*, *Lipothrixviridae*: *beta*, *gamma*, *delta*, *Pleolipoviridae*, *Spiraviridae* e *Rudiviridae* (BOUNDLESS MICROBIOLOGY, 2016).

Vírus de DNA que possuem grande núcleo citoplasmático, conhecidos como *NCLDV, nucleocytoplasmic large DNA viruses,* ainda não possuem uma ordem definida. Atualmente está sendo proposta a criação de uma nova ordem denominada Megavirales para agrupar esses vírus gigantes que contêm um conjunto de genes nucleares, unindo sete famílias de vírus que infectam diversos eucariotas: as famílias *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Marseilleviridae*, *Phycodnaviridae* e *Mimiviridae*, bem como os recentemente descobertos vírus gigantes Pandora-virus e *Pithoviruses* (YUTIN; WOLF; KOONIN, 2014).

A família *Phycodnaviridae* representa um grupo diverso de dsDNA. São vírus nus que apresentam um cápside de morfologia icosaédrica, entre 100 a 220 nânometro (nm) de diâmetro, cujos genomas variam de 160 quilobase (kb) a 560 kb. Como o nome sugere, a família *Phycodnaviridae* infectam algas eucarióticas e é composta por seis gêneros: *Chlorovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus*, *Raphidovirus* e *Coccolithovirus*. Inclui uma gama de hospedeiros de algas unicelulares e multicelulares que crescem tanto em água doce como em ambientes marinhos. Alguns dos hospedeiros algais não possuem um relacionamento filogenético próximo como, por exemplo, *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas marrons) e *Coccolithaceae (cocolitóforos)*. (VAN ETTEN; MEINTS, 1999).

1.4.4.1.2 Vírus de ssDNA

Outro grupo de vírus classificado pelo sistema de Baltimore são os vírus de fita simples (ssDNA), tais vírus pertencentes ao grupo II. Os representantes de todas as famílias

não apresentam envoltório e a maior parte deles tem capsídeo com simetria icosaédrica, com exceção da família *Inoviridae*. Ao contrário do que é observado entre os vírus do grupo I, muitos dos quais apresentam os maiores genomas virais conhecidos, no grupo II são encontrados muitos vírus que têm os menores genomas já relatados. Os genomas variam entre 1,8 Kb e 9 Kb, sendo a maioria com topologia circular, exceto a família *Parvoviridae* que contém genoma linear. A presença de genomas segmentados só é observada em membros das famílias *Nanoviridae* (6-8 segmentos) e *Geminiviridae* (1-2 segmentos) (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS, 2011).

No grupo II estão incluídos vírus que infectam vertebrados, invertebrados, plantas e bactérias. A replicação dos vírus ssDNA ocorre em parte do núcleo e em parte no citoplasma. Durante a cópia do material genético, a fita simples de DNA é utilizada para a produção de fita complementar, que serve de molde para a posterior síntese do genoma da progênie viral (CAMPOS, 2017).

Este grupo II compreende sete famílias virais de acordo com o ICTV, 2017, que ainda não possuem uma ordem definida. São essas famílias as *Anelloviridae*, *Circoviridae*, *Geminiviridae*, *Inoviridae*, *Microviridae*, *Nanoviridae* e *Parvoviridae*. No entanto, 4 outras famílias deste grupo estão sendo propostas como as famílias: *Bidnaviridae* (fazia parte da família *Parvoviridae*), *Genomoviridae*, *Pleolipoviridae*, *Spiraviridae* e *Turriviridae*, as últimas três famílias foram descritas em Archaea. O primeiro vírus ssDNA descrito de Archaea foi o *Halorubrum pleomorphic* virus 1, com genoma circular, e o segundo vírus foi o *Aeropyrum coil-shaped virus* (ACV), em forma de serpentina ou bobina (ICTV, 2016; PRANGISHVILI, 2013).

Além dos vírus de Archaea existem os bacteriófagos de ssDNA como, por exemplo, a família *Inoviridae* cujo representante é a espécie *Enterobacteria fago M13* que infecta bactéria *Escherichia coli*, este fago é classificado como temperado, já que ele não causa a lise do seu hospedeiro (CARTER, 2013).

Outros vírus de grande importância para o ecossistema marinho são os vírus que apresentam simples fita de DNA, considerados pequenos e que apresentam genoma circular. Os representantes apresentam cápside de simetria icosaédrica (~ 38 nm de diâmetro), com genoma de 6005 nucleotídeos e um segmento linear de 997 nucleotídeos. O membro *Chaetoceros salsugineum* de inclusão nuclear (CsNIV), ainda sem classificação de família, gênero *Bacilladnavirus* infectam diatomáceas do gênero *Chaetoceros*, além de outras algas eucarióticas, bactérias heterotróficas, protistas heterotróficos, e cianobactérias (GALINARI, 2011).

1.4.4.1.3 Vírus dsDNA-RT

Vírus dsDNA-RT são vírus que possuem genoma constituído por DNA fita dupla circular e pequeno. O genoma possui uma cadeia de sentido negativo mais longo e uma cadeia de sentido positivo, com comprimento variável, formando um DNA de cadeia parcialmente dupla. Seus genomas de DNA são replicados via um intermediário de RNA, ou seja, sua replicação envolve a transcrição reversa (ICTV, 2011).

No sistema de classificação de Baltimore, tais vírus pertencem ao grupo VII, com tamanho variando entre 3 e 8,3 Kb, capaz de codificar cerca de 7 ou 8 proteínas. Como representantes deste grupo temos a família *Hepadnaviridae,* composta por vírus que infectam vertebrados (por exemplo vírus da Hepatite B) e *Caulimoviridae* que reune vírus que infectam exclusivamente plantas , cujos gêneros são *Badnavirus*, *Caulimovirus*, *Cavemovirus*, *Petuvirus*, *Rosadnavirus*, *Solendovirus*, *Soymovirus* e *Tungrovirus* (ICTV, 2011). As partículas virais da família *Hepadnaviridae,* são esféricas e medem de 40 a 48 nanometros de diâmetro, com capsídeos icosaédricos e com envoltórios (ICTV, 2011). Entretanto, os membros da família *Caulimoviridae* são não-envelopados, com simetria icosaédrica (45 a 50 ηm de diâmetro) ou baciliforme (900 ηm). A replicação viral ocorre parte no citosol e parte no núcleo. Ao contrário dos vírus ssRNA-RT, que executam a transcrição reversa assim que entram na célula, nos vírus dsDNA-RT este processo ocorre durante a maturação das partículas virais, posteriormente a complementação das falhas na dupla fita e da transcrição do DNA em RNA no núcleo celular.

1.4.4.2 Vírus de RNA

1.4.4.2.1 Vírus de (+) ssRNA

Os vírus de RNA de fita simples senso positivo, (+) ssRNA, no sistema de classificação de Baltimore são classificados no grupo IV. Compreendem 29 famílias virais e são os vírus mais abundantes do planeta. Possuem genoma linear, com tamanho variando entre 2,3 e 31 Kb e pode ser constituído por um único segmento ou por até cinco moléculas de RNA. O genoma tem características de RNAm viral, permitindo a tradução direta de proteínas e, consequentemente, é considerado infeccioso por si só (LODISH et al., 2002).

Os vírus deste grupo inclui a Ordem Nidovirales (*Arteriviridae*, *Coronaviridae e Roniviridae*), a Ordem Picornavirales (*Dicistroviridae*, *Iflaviridae*, *Marnaviridae*,

Picornaviridae, *Secoviridae*) e a Ordem Tymovirales (*Alphaflexiviridae*, *Betaflexiviridae*, *Gammaflexiviridae*, *Tymoviridae*); e as famílias cujas ordens ainda não foram definidas: *Astroviridae*, *Barnaviridae*, *Bromoviridae*, *Caliciviridae*, *Closteroviridaae*, *Comoviridae*, *Flaviridae*, *Hepeviridae*, *Leviridae* (bacteriófago), *Luteoviridae*, *Narnaviridae*, *Nodaviridae*, *Potyviridae*, *Tetraviridae* (infectam Bacteria e Archaea), *Togaviridae*, *Tombusviridae*, *Virgaviridae* (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS- ICTV, 2011).

1.4.4.2.2 Vírus de (-) ssRNA

Os vírus que possuem material genético constituído por RNA de fita simples senso negativo, (-)ssRNA, pertencem ao grupo V, que compreendem 8 famílias virais (ICTV, 2011).

Possuem genoma linerar, com tamanho variando de 9 a 19 Kb, podendo ser composto por 1 ou até 8 segmentos, cujo RNA é complementar à do RNAm viral, atuando como molde para a sintese do RNAm. Todos os vírus de (-) ssRNA possuem partículas virais com capsídeos de simetria helicoidal, com excessão a família *Ophioviridae*, que apresenta capsídeo filamentoso flexível, e é composta por vírus que infectam plantas. O grupo V reune muitos vírus que são agentes etiológicos de doenças humanas como as famílias: *Paramyxoviridae* (causa sarampo em humanos), *Orthomyxoviridae* (influenza), *Rhabdoviridae* (raiva), *Filoviridae* (hantavirose pelo vírus ebola), *Bunyaviridae* (hantavirose), e *Arenaviridae* (febre de Lassa) (LODISH et al., 2002).

A infecção só ocorrerá se todos os segmentos estiverem disponíveis simultaneamente no interior da célula hospedeira. As ordens deste grupo são: ordem *Mononegavirales*, *Bornaviridae*, *Filoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* e as famílias que ainda não possuem uma ordem definida: *Arenaviridae*, *Bunyaviridae*, *Ophioviridae* e *Orthomyxoviridae* (ICTV, 2017).

1.4.4.2.3 Vírus de dsRNA

Os vírus dsRNA ou RNA fita dupla fazem parte do grupo III e compreende 9 família virais. Possuem genoma com tamanho variando de 3,7 a 30,5 Kb, sendo todos com topologia linear e segmentada. Neste grupo são encontrados agentes infecciosos de vertebrados, invertebrados, plantas, micro-organismos eucarióticos e bactérias. A replicação de todos os vírus deste grupo ocorre no citosol (ICTV, 2011).

As famílias que representam este grupo de vírus são: *Birnaviridae* (infectam peixes), *Chrysoviridae* (infectam fungos), *Cystoviridae*, *Endornaviridae* (infectam fungos), *Hypoviridae* (infectam fungos), *Partitiviridae* (infectam fungos), *Picobirnaviridae* (infectam humanos), *Reoviridae* (infectam humanos), *Totiviridae* (infectam fungos) (COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS, 2011).

1.4.4.2.4 Vírus de ssRNA-RT

Três famílias de vírus pertencem ao grupo VI, cujos representantes possuem RNA fita simples, senso positivo (ssRNA-RT), e que replicam o material genético gerando moléculas de DNA dupla fita (dsDNA) intermediárias. Os vírus ssRNA-RT levam a denominação "RT" em função de codificarem a enzima transcriptase reversa: uma DNA polimerase RNA dependente, empregada no processo de transcrição.

Os vírus ssRNA-RT possuem genoma linear, com tamanho variando de 4,9 a 11 Kb. Dentro deste grupo, os vírus da família *Retroviridae* possuem morfologia mais bem caracterizada. Os retrovírus apresentam partículas virais esféricas e envelopadas, com 80 a 100 nanômetro de diâmetro. Como no grupo III, ainda não possuem ordem definida, cujas famílias são : *Retroviridae*, *Metaviridae*, *Pseudoviridae* (ICTV, 2017).

1.4.4.3 Importância do vírus no ambiente aquático

1.4.4.3.1 Vírus de Eukaryota no ambiente aquático

1.4.4.3.1.1 Vírus ambientais

A importância dos vírus no ecossistema aquático deve-se à dinâmica da população de fitoplâncton marinho, porque estes micro-organismos são a base da cadeia alimentar biológica dos oceanos e são responsáveis por cerca de um terço da produção primária global. Os vírus ao agirem como agentes de mortalidade do fitoplâncton podem quebrar a teia alimentar dos organismos pelágicos, dessa forma, desviam a matéria orgânica dos níveis tróficos superiores para os organismos microbianos (MIDDELBOE, 2008).

Os vírus que são capazes de infectar as algas pertencem à família *Phycodnaviridae*. Os representantes desta família são vírus que possuem um genoma de DNA de fita dupla, cujo tamanho varia de 100 a 560 Kb. O capsídeo é icosaédrico que compreende de 100 a 220

nanômetros (nm) de diâmetro e ausência de envoltório. Estes vírus infectam algas eucarióticas que, por sua vez, apresentam grande diversidade genética. A família *Phycodnaviridae* apresenta uma grande variedade de hospedeiros. Os membros desta família infectam três gêneros de algas diferentes como *Micromonas, Heterocapsa e Heterosigma,* que são algas unicelulares e multicelulares e que crescem tanto em água doce como em ambientes marinhos (GALINARI, 2011).

Alguns dos seus hospedeiros algais não possuem um relacionamento filogenético próximo como, por exemplo, *Chlorophyceae* (algas verdes), *Phaeophyceae* (algas marrons) e *Coccolithaceae (cocolitóros)*. Os representantes dos vírus que infectam a família *Coccolithaceae* pertencem à seis gêneros: *Chlorovirus*, *Prasinovirus*, *Prymnesiovirus*, *Phaeovirus*, *Raphidovirus* e *Coccolithovirus* (VAN ETTEN; MEINTS, 1999).

Os vírus que infectam o fitoplâncton podem realizar um controle populacional semelhante ao que ocorre no bacterioplâncton. Vários fatores podem influenciar este controle como a especificidade pelo hospedeiro, as variações ambientais e a capacidade de penetração. Além disso, estes vírus tem a capacidade de atacar a camada externa da alga, pois digerem enzimaticamente uma porção da parede celular hospedeira e, dessa forma, introduzem o material genético viral dentro do hospedeiro, deixando o capsídeo vazio na superfície.

Acredita-se que o ciclo de replicação dos ficodnavírus provavelmente seja no núcleo do hospedeiro (MING KANG, DAVID, 2005) diferentemente do que ocorre nas famílias *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, e *Mimiviridae*, assim como, com os vírus gigantes recentemente descobertos Pandora-virus e *Pithoviruses,* que entram no hospedeiro através da fagocitose, cujo ciclo de replicação ocorre no citoplasma (MUTSAFI et al., 2014).

Embora as famílias *Poxviridae*, *Asfarviridae*, *Iridoviridae*, *Ascoviridae*, *Marseilleviridae*, *Phycodnaviridae* e *Mimiviridae*, bem como os vírus gigantes recentemente descobertos Pandora-vírus e *Pithoviruses*, sejam classificados dentro de um grupo denominado vírus de DNA com grande núcleo citoplasmático (NCLDV), atualmente estão sendo atribuídos à nova ordem chamada Megavirales. Enquadram-se ainda nesta ordem os vírus menores, embora ainda gigantes, que infectam *Acanthamoeba* spp., isolados de amostras de água em 2008, que compõem a família *Marseilleviridae* (YOOSUF et al., 2014; YUTIN; WOLF; KOONIN, 2014).

Os membros de NCLDV infectam animais, incluindo seres humanos, e diversos micro-organismos eucarióticos unicelulares e multicelulares. Replicam-se exclusivamente no citoplasma das suas células hospedeiras ou abrangem estágios nucleares e citoplasmáticos nos seus ciclos de reprodução. Isto é possível uma vez que eles carregam a maior parte dos genes

necessários para replicação do DNA, metabolismo e transcrição. Até hoje não se tem muito conhecimento a respeito da origem destes vírus, mas quase todos os vírus gigantes carregam genes homólogos de Bacteria, Archaea e Eukaryota (PIÉGU et al., 2015).

Os membros da família *Mimiviridae* são parasitas obrigatórios do protozoário *Acanthamoeba polyphaga* (Classe Ryzopoda ou Sarcodina). Na década de 1980, após um surto de pneumonia humana, estes micro-organismos foram descobertos e associados à contaminação por amebas (MONIRUZZAMAN et al., 2014). Em 2014, Moniruzzaman et al. isolaram uma série de patógenos provenientes desse surto, entre eles um agente patogênico que se assemelhava a uma bactéria gram-positiva em forma de coco, denominada *Bradford coccus*. No entanto, o gene 16S ribossomal da bactéria não foi amplificado por PCR nem tampouco a morfologia bacteriana característica confirmada por microscopia eletrônica, ao contrário, foi observado uma estrutura icosaédrica viral. Somente em 2003, pesquisadores da Université de la Méditerranée em Marseille, França, identificaram este micro-organismo como sendo um vírus e, consequentemente, o coco de *Bradford* foi renomeado como *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV).

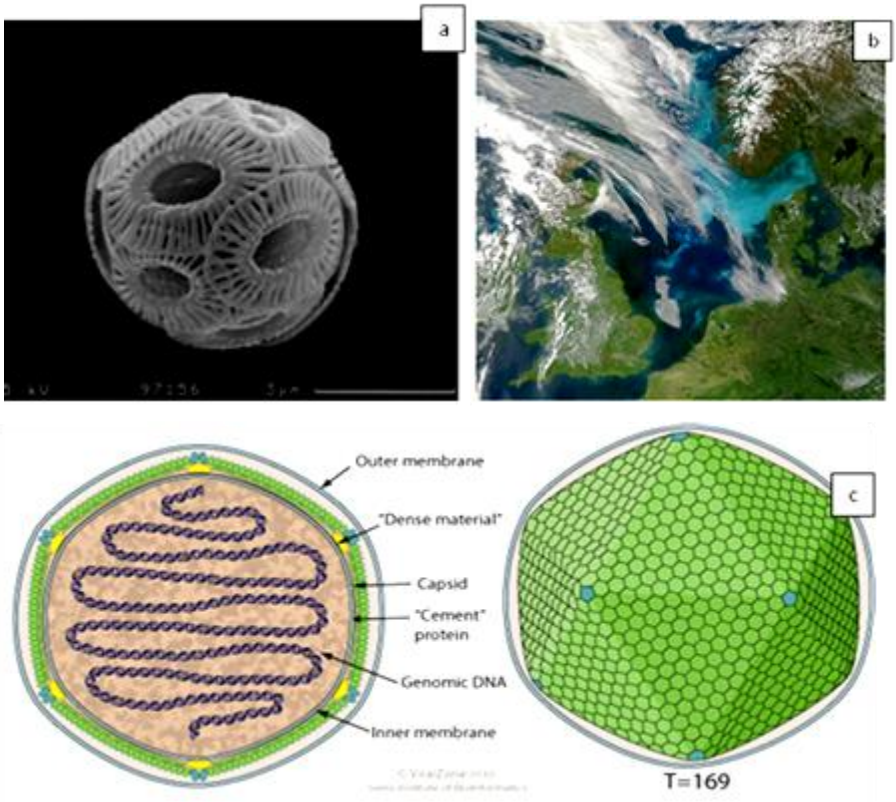
Estudos revelaram que o genoma desses vírus apresentava cerca de 1,181 Kb, podendo codificar mais de 900 proteínas, incluindo alguns genes nunca identificados anteriormente (PIÉGU et al., 2015; SCOLA et al., 2003). São vírus complexos e possuem dezenas ou até centenas de proteínas, assim como, seu próprio RNAt (RNA transportador), sendo assim, os tornam menos dependentes do hospedeiro para realizar o ciclo replicativo (SHARMA et al., 2016).

Em 2016, Soares verificou que, durante a infecção em *Acanthamoeba polyphaga*, o APMV é capaz de se reproduzir em estruturas citoplasmáticas denominadas “fábricas virais”, onde parece ocorrer a maioria da transcrição dos genes, com pouca ou nenhuma participação do aparato de transcrição do hospedeiro localizado no núcleo celular (SOARES, 2016).

Além da mortalidade, os ficodnavírus estão envolvidos nas florações excessivas das algas, gerando danos ambientais e prejuízos econômicos (GALINARI, 2011). Em 1999, esse fenômeno foi observado em um lago do Reino Unido, com os vírus que infectam algas da espécie *Emiliania huxleyi*, denominados *Emiliania huxleyi* (EhV), posteriormente, esse mesmo fenômeno foi observado em oceanos.

Esta alga é uma espécie de cocolitóforo (figura 6), um fitoplâncton unicelular encontrado em quase todos os ecossistemas oceânicos, cujas florações podem alcançar uma área de mais de 10^4 km^2 (GALINARI, 2011).

Figura 6- O cocolitóforo da espécie *Emiliania huxleyi e* o vírus EhV.



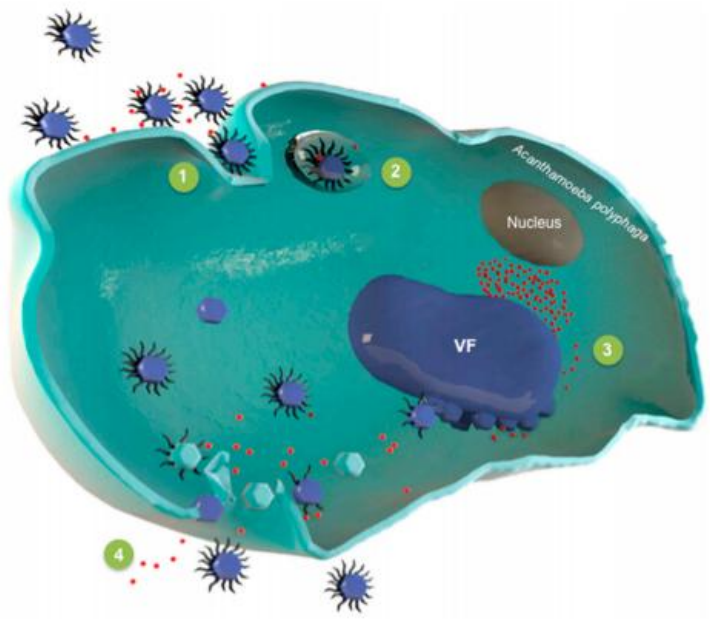
Fonte: Lohbeck et al. (2013). (a) Imagem de micrografia eletrônica de varredura da espécie *Emiliania huxleyi*, (b) Imagem de satélite de uma floração da espécie *Emiliania huxleyi* (em azul turquesa) na costa norueguesa e (c) Representação esquemática do nucleocapsídeo de *Coccolithovirus*.

Juntamente com os mimivírus foram detectados os virofagos que são vírus de dsDNA circular e icosaédricos que se replicam usando a maquinaria de replicação de vírus gigantes, além disso, representam um modelo de dinâmica ecológica entre amebas, vírus gigantes e virofagos (QINGHAI et al., 2016). O termo "virofago" foi adotado porque esses vírus são dependentes da presença de uma co-infecção. Acredita-se que os virofagos são distribuídos amplamente em todo o mundo, até o momento foram descritos quatro virofagos: Sputnik, Mavirus, *Organic Lake Virophage* (OLV) e Zamilon (SOARES, 2016). Os mimivírus também são denominados de mamavírus, dependendo do ano de descoberta e publicação (ICTV, 2009).

O virofago Sputnik pertence à família *Lavidaviridae* e sua presença foi associada a morfologias anormais do capsídeo de mamavírus, cuja eficiência da penetração em células hospedeiras foi reduzida em 70% (BEKLIZ; COLSON; SCOLA, 2016).

A replicação do vírus Sputnik é dependente da co-infecção com um mimivírus em *Acanthamoeba polyphaga,* já que usam a maquinaria replicativa do mimivírus (figura 7) para sua própria propagação. Os virofagos Sputnik são fagocitados pela ameba juntamente com os mimivírus, uma vez que podem estar anexados às fibrilas presentes na superfície do vírus gigante. No entanto, foram encontradas variantes de mimivírus desprovidas de fibrilas, tornando-as, portanto, resistentes às infecções pelo virofago (BEKLIZ; COLSON; SCOLA, 2016).

Figura 7 - O ciclo de replicação dos virofagos.



Fonte: Bekliz; COLSON; Scola, (2016). (1) *Acanthamoeba polyphaga*; (2) Vírus gigante (azul) e o virofago (vermelho) internalizados em vacúolos da *Acanthamoeba polyphaga*, (3) Os vírus gigantes e os virofagos sendo sintetizados no compartimento *virus factory* (VF) e (4) Os dois tipos de vírus são liberados após a lise da *Acanthamoeba polyphaga.*

Em 2008, após a descoberta do virofago Sputnik, foram descritos outros dois virofagos: o Sputnik 2, descrito em 2012, que foi isolado do líquido da caixa de armazenamento de lentes de contato e o virofago Sputnik 3, detectado por PCR em 2013, oriundo de uma amostra de solo associado a linhagem C de mimivírus (BEKLIZ; COLSON; SCOLA, 2016).

O virofago Zamilon possui um genoma de dsDNA circular com tamanho de 17,276 pb. Quanto à replicação, acredita-se que ele seja seletivo e se propaga somente quando associado aos mimivírus da linhagens B ou C. Sua replicação ocorre na *virus factory* (VF) do mimivirus. Porém, a co-infecção de amebas com Zamilon e mimivírus não parecem interferir com a propagação de mimivírus, nem com a lise da ameba. (BEKLIZ; COLSON; SCOLA, 2016).

O virofago Mavirus foi isolado em 2010 de águas costeiras ao largo do Texas, EUA. Possui um genoma de dsDNA circular no interior de um capsídeo icosaédrico com 60 nm de diâmetro e sua replicação ocorre no flagelado *Cafeteria roenbergensis* de zooplâncton. Estudos baseados em microscopia eletrônica de transmissão revelaram que o mecanismo de entrada do Mavirus difere do Sputnik devido ao fato de que o Mavirus é endocitado independentemente do vírus *Cafeteria roenbergensis virus* (CroV), da família *Mimiviridae*, no entanto, ele não pode replicar sem a presença do CroV na *Cafeteria roenbergensis*. (BEKLIZ; COLSON; SCOLA, 2016).

Recentemente foi proposta a existência de um sistema de defesa gênico, chamado de Elemento de Resistência a Virofago de Mimivirus (*Mimivirus Virophage Resistance Element* - MIMIVIRE). Esse mecanismo, que confere resistência ao virofago Zamilon nas linhagens A de mimivírus, depende do reconhecimento de sequências curtas repetidas (15 nucleotídeos) por proteínas (SOARES, 2016).

Os genomas dos mimivírus apresentam padrões em determinadas sequências nucleotídicas, que são chamados de assinaturas genômicas (AG). No caso de interações vírus-hospedeiro, acredita-se que estes padrões podem ser utilizados para escapar de mecanismos de defesa do hospedeiro (SOARES, 2016).

1.4.4.3.1.2 Vírus patogênicos para humanos

Os vírus são estudados na área da saúde, pois são agentes etiológicos de diversas doenças que atingem potencialmente todas as espécies conhecidas, desde plantas a animais. Essas doenças podem gerar grandes prejuízos ao setor agropecuário e para a população humana em geral. Os enterovírus, por exemplo, é um grupo importante de vírus humanos pois causam vários tipos de enfermidades veiculadas pelas águas (TAVARES; PAULA; MARTA, 2005).

Entre os vírus entéricos mais conhecidos estão os poliovírus, os rotavírus, os calicivírus, alguns adenovírus e os vírus da hepatite A. A permanência destes vírus na água

potável, em águas de recreação, águas superficiais e de esgoto por vírus entéricos, pode representar um grande risco, porque a maioria destes vírus permanece infecciosa no ambiente por longos períodos de tempo, podendo ser transmitidos pela via fecal-oral através do consumo destas águas contaminadas, de alimentos contaminados, não havendo necessidade de grande quantidade de partículas virais para que ocorra a infecção e, consequentemente, a doença (QUEIROZ et al., 2001; TAVARES; PAULA; MARTA, 2005).

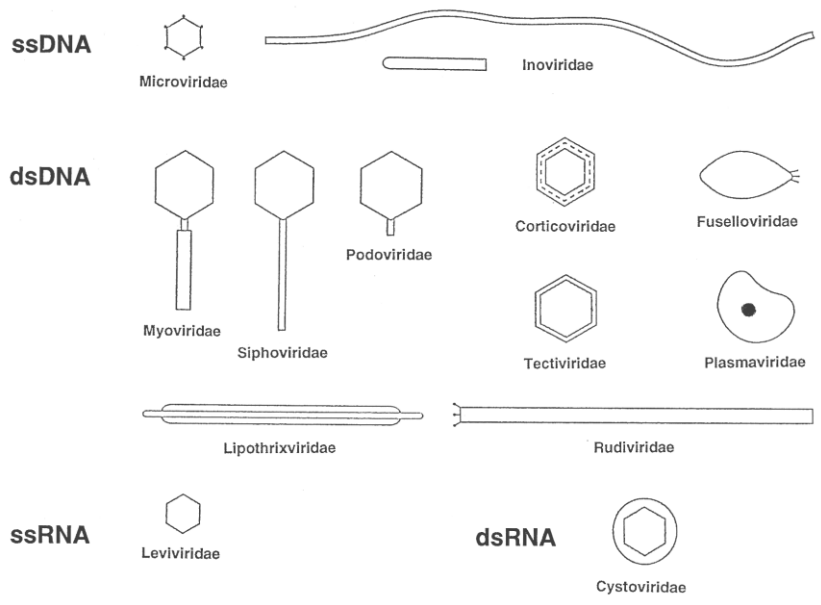
Estes vírus são resistentes aos tratamentos convencionais de esgoto e de água e também estão presentes em ambientes contaminados por matéria fecal humana (SYMONDS, 2008).

1.4.4.3.2 Bacteriófagos no ambiente aquático

Como citado anteriormente, o papel dos micro-organismos no ambiente aquático é relevante, pois influencia diretamente esse ecossitema, isoladamente ou através de interações entre eles. As bactérias, além da predação, são influenciadas pela concentração de nutrientes inorgânicos, pelas interações competitivas entre elas e as algas (competição por *habitats* e alimento) e, mais recentemente, os vírus também receberam destaque pelo seu papel nas cadeias alimentares aquáticas. Os últimos reciclam nutrientes, pois influenciam a densidade e a especificidade das espécies presentes nos *booms* de algas e também da comunidade de cianobactérias. Isso se deve porque os vírus são capazes de se alastrar na comunidade de forma sequencial, ou seja, ele infecta o primeiro hospedeiro e, em seguida, passa para outros hospedeiros, controlando o estado de equilíbrio da diversidade da comunidade bacteriana (FARJALLA et al., 2011, HISATUGO, 2012).

Os bacteriófagos são classificados em 13 famílias de acordo com a morfologia, tipo de ácido nucleico e presença ou ausência de envoltório. Em relação ao tipo de ácido nucleico, os fagos podem ser divididos em ssDNA, dsDNA, ssRNA e dsRNA. Em termos da morfologia dos fagos, podem ser icosaédricos com cauda, em forma de hélice (filamentosos) ou pleomórficos, como é possível ser observado na figura 8.

Figura 8- Famílias de fagos representadas esquematicamente de acordo com o respectivo genoma.



Fonte: Belleghem (2017).

Os bacteriófagos são capazes de causar disponibilização rápida de macromoléculas que compõe o *pool* de matéria orgânica dissolvida e particulada nos vários níveis da coluna d'água, além de serem responsáveis pela manutenção do equilíbrio das populações de hospedeiros através do processo denominado de *Kill the winner* (THINGSTAD, 2000).

Os fagos temperados também influenciam no ambiente aquático. Os fagos temperados são conhecidos por ocorrerem em muitos ecossistemas e são comuns em condições que são desfavoráveis ao crescimento do hospedeiro (BENCH, 2007). Esses vírus alteram o fenótipo das células hospedeiras através de troca genética (transdução específica e generalizada) ou por lisogenia, levando ao aparecimento de novos genótipos em populações de hospedeiros que se reproduzem por clones, já que são responsáveis pela transferência horizontal de genes entre bactérias. Essa interação pode conferir características especiais às bactérias, como a produção de toxina ou resistências a ação de alguns antibióticos como também podem servir de reservatório de genes para as comunidades procarióticas (MUNIESA; IMAMOVIC; JOFRE, 2011).

Os fagos possuem densidades superiores a 10^8 vírus/cm^3, tem alta especificidade pelo hospedeiro e muitos parasitam um grupo específico de certas espécies,ou seja, não atuam sobre todas as bactérias que estão disponíveis no habitat, mas sim em populações individuais (MIDDELBOE, 2008; ABELES; PRIDE, 2014).

Ao infectar a bactéria, os fagos proporcionam grande pressão evolutiva, estimulando mutações e adaptações, além de, influenciar o *pool* genético existente. Um estudo *in vitro*

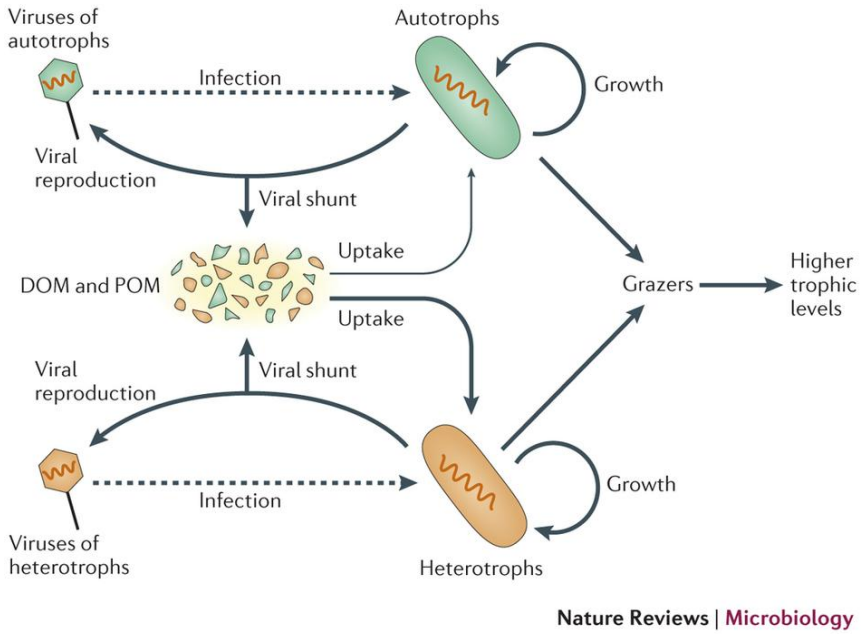
utilizando um fago e seu hospedeiro *Pseudomonas fluorescens* revelou um aumento de 10 a 100 vezes na taxa de mutação em comparação com bactérias crescidas na ausência de fagos (ABELES; PRIDE, 2014).

No entanto, sabe-se hoje que os fagos podem promover a coexistência de diversas populações bacterianas em um ambiente aquático e que, ao lisar uma bactéria, fornece nutrientes para as outras que não foram infectadas pelos fagos. Além disso, há indícios que a presença de bacteriófago na água do mar estimula o crescimento das cianobactérias por causa da ciclagem de nutrientes que os fagos proporcionam (MIDDELBOE, 2008).

Comparativamente às bactérias, os vírus ocorrem em elevada abundância, pois, ao diminuir a quantidade de bactéria no ambiente, garantem a outras populações de organismos a oportunidade de se proliferar, em detrimento da população que sofreu a ação lítica. Isto faz com que os vírus também tenham importante papel na modificação da estrutura da comunidade microbiana, pois a morte de um determinado grupo de bactérias dominantes gerada pelos vírus pode favorecer a outro grupo de bactérias, que não conseguiriam estabelecer uma comunidade no mesmo ecossistema, facilitando assim, a coexistência de espécies que não são tão competitivas (HISATUGO, 2012). No entanto, ainda é conhecido muito pouco sobre bacteriófagos líticos e seu papel nas teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos (THOMAZ, 1999).

Diariamente, entre 5 % a 30 % de bactérias heterotróficas e 5 % a 40 % de cianobactérias são lisadas pelos fagos no ambiente marinho, consequentemente, ocorre liberação de aproximadamente 5 a 40 % de matéria orgânica dissolvida (*shunt viral*) para o ambiente (figura 9). A matéria orgânica contém os vírus e os detritos celulares (monômeros, oligômeros e polímeros, coloides e fragmentos celulares), que são transformados em alimentos possíveis de serem absorvidos pelas bactérias, representando um *loop* trófico semifechado, onde a biomassa bacteriana é consumida primariamente por outras bactérias reduzindo a transferência de carbono para níveis tróficos mais altos, além de exportação de partículas (*sea-floor*) (MIDDELBOE, 2008; GALINARI, 2011). Sendo assim, este mecanismo pode ser considerado a chave para suprir o carbono de bactérias heterotróficas no ambiente aquático (MIDDELBOE, 2008).

Figura 9 – Representação esquemática do ciclo biogeoquímico, onde as bactérias autotróficas e heterotróficas são predadas e infectadas.



Fonte: Jover et al. (2014).

Muitas das gerações de baterias possuem algumas resistências à infecção de vírus ou a entrada de material genético estranho. No entanto, a incidência da resistência em populações de bactérias heterotróficas marinhas não foi avaliada diretamente, pois a maioria delas não se reproduzem em meio de cultura. Existem três possíveis explicações ou teorias para essa resistência, a primeira é que produção de vírus não é tão alta como parece ser. Segunda, a resistência pode ser causada pela perda de alguns receptores importantes para a bactéria, e esta resistência seria dispendiosa em termos fisiológicos para os organismos resistentes, tornando-as sensíveis no habitat, mesmo quando os vírus estão presentes. E a terceira, a resistência pode ser possível através da pseudolisogenia, mas isto não é bem compreendido até o momento (LEVASSEUR et al., 2016).

No entanto, sabe-se que tanto os domínios Bacteria e Archaea adquirem resistências à entrada de elementos genéticos como plamídeos e fagos através de mecanismos como a clivagem do genoma invasor pelo sistema CRISPR-Cas. O sistema CRISPR incorpora pequenos fragmentos de DNA e, posteriormente, usa o RNA transcrito como guia para destruir o elemento invasor. O sistema CRISPR é capaz de memorizar e atacar de forma discriminatória os invasores, sendo encontrado em aproximadamente 48 % e 80 % nos domínios Bacteria e Archaea, respectivamente (LEVASSEUR et al., 2016).

O CRISPR consiste em repetições diretas, não continuas, de 20 a 50 pares de bases (pb) de comprimento que são separadas por sequências variáveis, geralmente derivadas de vírus ou plasmídeos. Esse sistema foi detectado em organismos filogeneticamente distantes e sugere que ocorre troca genética por transferência horizontal de genes (CHÉNARD; WIRTH; SUTTLE, 2016).

Um estudo realizado com o cianofago (N-1) e seu respectivo hospedeiro (*Nostoc* spp.) demonstrou que o N-1 possui uma matriz CRISPR semelhante a que foi encontrada em cianobactérias, sugerindo que provavelmente os cianofagos desempenham um papel na troca de CRISPRs entre cianobactérias (CHÉNARD; WIRTH; SUTTLE, 2016).

O paradoxo denominado paradoxo do plâncton de Hutchinson questiona como tantos diferentes tipos de fitoplâncton podem coexistir, dependendo apenas de alguns recursos potencialmente limitantes quando, em contrapartida, a Teoria da Competição prevê apenas um ou poucos sobreviventes nessas condições. A atividade viral contribui para a resposta deste paradoxo, pois os organismos dominantes e sobreviventes após a competição tornam-se particularmente mais susceptíveis à infecção viral, enquanto que as espécies mais raras estão relativamente protegidas (GALINARI, 2011).

Em ambientes dulcícolas eutróficos, os bacteriófagos são os principais responsáveis pela mortalidade bacteriana favorecendo, consequentemente, a ciclagem de nutrientes. Já em ambientes oligotróficos, os bacteriófagos também participam da mortalidade bacteriana, em menor proporção, mas com a mesma importância de outros ambientes. A lise fornecerá matéria orgânica dissolvida para o meio que, por sua vez, poderá ser aproveitada por outros micro-organismos, sendo responsável pela manutenção da produção bacteriana. Este fato também mostra como uma mudança ambiental pode influenciar o papel dos micro-organismos na cadeia trófica (GALINARI, 2011).

1.4.4.3.2.1 Multiplicação viral em ambientes aquáticos

Os vírus são habitantes naturais em todos ecossistemas e, em sistemas aquáticos, são vistos como parte do ecossistema e não como causas de doenças infecciosas. No ambiente dulcícola ocorre uma concentração maior de vírus do que no ambiente marinho. Embora o papel ecológico dos vírus nos ambientes marinhos e dulcícolas seja semelhante, apresentam pequenas diferenças na presença de espécies entre os dois ambientes (GALIZIA, 2016).

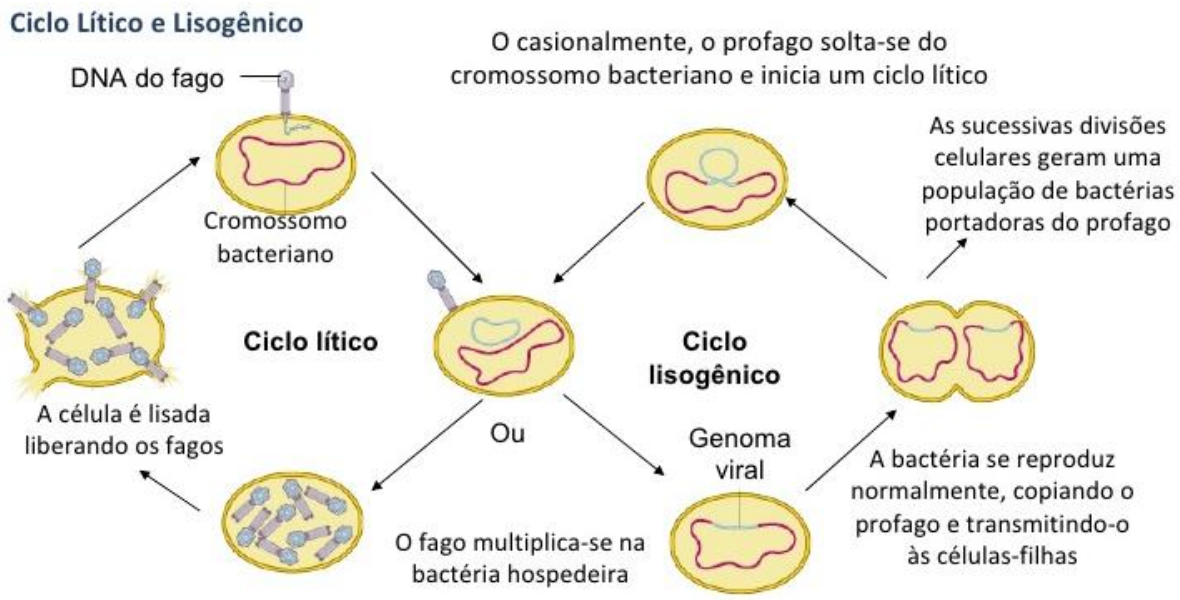
Dois tipos de ciclos de replicação de vírus são conhecidos: ciclo lítico e ciclo lisogênico (figura 10). Os vírus utilizam o material genético da célula hospedeira para

promover a sua replicação (PEREIRA et al., 2009). São classificados em virulentos ou lisogênicos, dependendo do modo como eles realizam a sua multiplicação. Tanto o ciclo lítico quanto o ciclo lisogênico se iniciam com a adsorção ou fixação dos vírus em células hospedeiras, etapa onde as glicoproteínas virais se ligam aos receptores celulares presentes na célula hospedeira (relação específica entre os vírus e seus hospedeiros). Os vírus recém formados também podem sair da célula hospedeira por um processo de brotamento sem ruptura, mas este processo ocorre em frequência baixa nos ecossistemas aquáticos (GALINARI, 2011).

O fago virulento utiliza a via de replicação chamada de ciclo lítico e, ao entrar na bactéria, inicia-se um processo intenso de formação de novos vírus que provoca a lise da célula hospedeira e, consequentemente, liberação de novos vírus capazes de infectar novas células hospedeiras, além de conteúdos celulares para o meio ambiente (GALINARI, 2011).

Já os fagos lisogênicos se incorporam ao genoma da célula hospedeira que, por sua vez, continua se multiplicando normalmente. Quando o genoma viral torna-se parte do genoma da célula hospedeira é denominado profago que pode ser mantido na célula hospedeira por um período indeterminado (período de latência), podendo ou não lisá-las (WITHEY et al., 2005).

Figura 10 - Representação esquemática dos tipos de ciclos virais que podem ocorrer no ambiente aquático.



Fonte: Vieira (2017).

Os ciclos líticos e lisogênicos são considerados como estratégias virais de grande importância ecológica. Acredita-se hoje que o ciclo mais frequente em água doce é o ciclo lisogênico e o que determina esta estratégia, muitas vezes, é o estado fisiológico do hospedeiro. O ciclo lisogênico apresenta vantagens em relação aos demais, pois devido ao fato do profago estar inserido dentro do genoma, este permanecerá integrado até que exista uma situação que leve o vírus a entrar em ciclo lítico (GALINARI, 2011).

Os profagos podem conferir novas propriedades às células do hospedeiro, incluindo o aumentando de imunidade contra novas infecções virais ou superinfecção por fagos homólogos. Como resultado da interação do profago no genoma bacteriano, novas características metabólicas, morfológicas ou imunogênicas desta interação podem ser proporcionadas às bactérias (GALINARI, 2011).

A repressão não somente da expressão dos genes líticos, mas também genes de processos metabólicos desnecessários aos hospedeiros, em condições desfavoráveis do meio em que estão inseridos, proporciona economia metabólica à célula hospedeira, até que as condições ambientais sejam novamente favoráveis ao seu crescimento (GALINARI, 2011). Em contrapartida, assim que o ambiente for novamente favorável à sobrevivência do hospedeiro, os profagos podem provocar a mortalidade do hospedeiro sendo, por isso, considerado uma bomba relógio molecular (GALINARI, 2011).

A interação vírus-hospedeiro denominada de pseudolisogenia, ocorre quando o ácido nucleico viral pode permanecer em uma célula hospedeira por algum tempo (possivelmente durante algumas gerações) antes que a lise ou destruição da célula ocorra. A pseudolisogenia pode estar relacionada com a carência de nutrientes do hospedeiro, em razão disto, o vírus adota um estado inativo, sendo incapaz de iniciar a expressão de genes virais, devido ao baixo metabolismo da célula. A atividade viral normal volta quando a célula hospedeira volta ao seu estado energético normal (SERRONHA; LOURENÇO; SOBRAL, 2005).

No entanto, há uma classificação proposta por Abedon (2008) que coloca a infecção fágica em três categorias: produtiva, lisogênica e não produtiva. A infecção produtiva subdivide-se, por sua vez, em infecção crônica e lítica, proporcionando ou não a sobrevivência do hospedeiro, respectivamente. A lisogênica pode ou não provocar a lise e, por último, a não produtiva que, por sua vez, subdivide-se em três subcategorias denominadas pseudolisogênica, restritiva e abortiva, podendo ou não causar lise na célula hospedeira (MARQUES, 2011).

1.4.4.3.2.2 Transferência de genes em ambientes aquáticos

Estudos de análise genômica revelaram que existe transferência horizontal de genes (THG) entre os vírus e seus hospedeiros. Como exemplo, podemos citar a presença, em determinados vírus aquáticos, de genes específicos da maquinaria fotossintética, como as proteínas D1 e D2 que estão presentes em cianobactérias, e também encontradas em cianofagos juntamente com os genes homólogos *psbA e psbD* que participam no processo de fotossíntese (SERRONHA; LOURENÇO; SOBRAL, 2005).

Portanto, a THG é um mecanismo alternativo de aquisição de genes que envolve o movimento de material genético entre espécies diferentes. O THG pode ocorrer na bactéria através da conjugação, transdução e transformação. A conjugação envolve a transferência de DNA através de um plasmídeo, entre células doadoras e receptoras recombinantes. A transdução, o DNA bacteriano é movido para outra bactéria através do bacteriófago. A transformação, que é outro processo, envolve uma alteração genética de uma bactéria que resulta da absorção de material genético estranho, seja ele DNA ou RNA (SERRONHA; LOURENÇO; SOBRAL, 2005).

A THG é mais conhecida entre organismos unicelulares como bactérias, já que os genomas bacterianos estão em constante fluxo gênico, onde qualquer segmento de DNA pode ser horizontalmente transferido. Porém, apenas uma pequena porcentagem do DNA adquirido será mantida na célula receptora e transferida para gerações subsequentes, pois muitos mecanismos limitam as aquisições horizontais de genes. Dentre esses mecanismos, encontram-se modulações fisiológicas, ambientais e genéticas. A transferência horizontal é uma importante ferramenta na adaptação de procariotos à um nicho específico, pois a aquisição de um conjunto gênico já preparado e melhorado aumenta a adaptabilidade destes organismos (LAWRENCE et al., 2002).

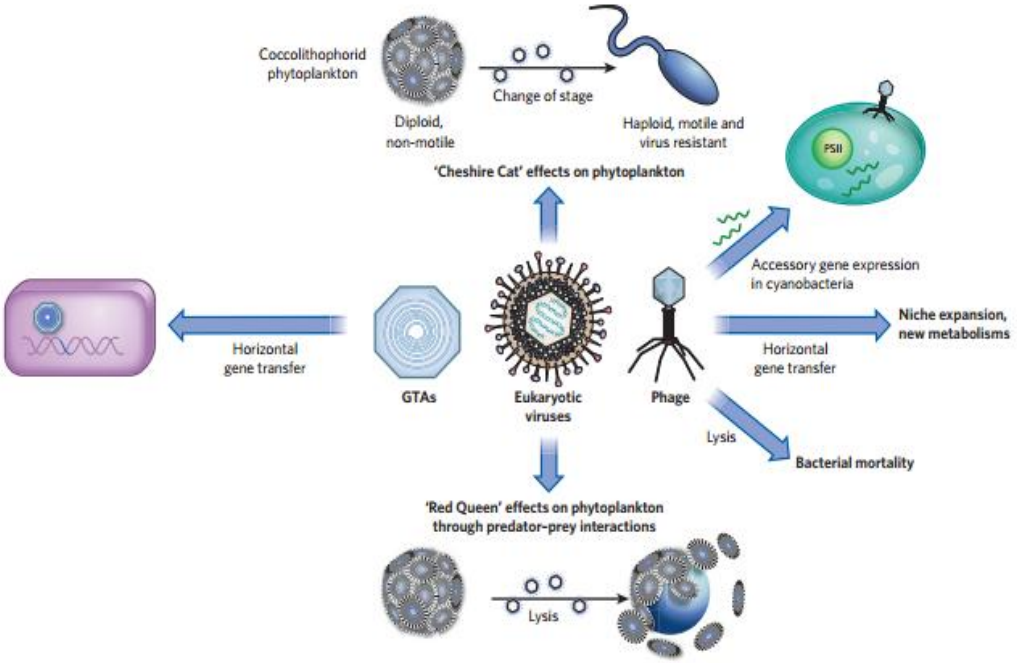
Além da transformação e da transdução, existem outros mecanismos de troca de genes entre micro-organismos, como fusão temporária de célula, seguida por recombinação cromossômica e troca de plasmideos, conexão intercelular através dos nanotubos e a liberação de vesículas de membrana, contendo cromossomos e plasmídeos com o DNA de fago. O material genético, após ser liberado para o ambiente em que estão inseridos, pode se fundir com as células hospedeiras mais próximas (LANG; ZHAXYBAYEVA; BEATTY, 2012).

Atualmente, o conhecimento dos genomas microbianos completos dos domínios Archaea e Bacteria revelou que a THG é um fator importante na adaptação dos micro-organismos e que essa transferência geralmente resulta em mudanças genéticas nos

hospedeiros, possibilitando sua adaptação à um ambiente em constante mudança, seja de temperatura e/ou nutrientes (GARCIA-VALLVE; ROMEU, 2000).

Outro mecanismo que possibilita a troca de genes é mediado pelos Agentes de Transferência de Genes (ATGs). Morfologicamente os ATGs são semelhantes aos fagos, com cauda e cabeça, porém não apresentam todas capacidades e características típicas dos fagos. Provavelmente os ATGs tenham sido derivados de bacteriófagos que perderam sua capacidade de autopropagação. Os ATGs transferem material genético de forma semelhante à transdução, no entanto, a produção de ATGs não é o resultado de uma infecção por fago (figura 11) (ROHWER; THURBER, 2009).

Figura 11 – Desenho esquemático dos vírus marinhos e as entidades semelhantes a vírus, incluindo vírus eucarióticos, fagos e ATGs (GTAs, *gene transfer agents*).



Fonte: Rohwer; Thurber (2009).

1.4.4.3.3 Vírus de Archaea no ambiente aquático

Além dos bacteriófagos, existem também os vírus de Archaea que foram inicialmente denominados de fagos e, subsequentemente, de Halofagos até serem classificados como vírus de Archaea (ABEDON; MURRAY, 2013).

O bacterioplâncton é constituído de até 34 % de Archaea, nas águas costeiras da Antártida, e entre 40 a 60% em águas temperadas (200 a 600 m) e, portanto, é provável que

os vírus de Archaea constituam uma proporção significativa do virioplâncton nesses ambientes (WOMMACK; COLWELL, 2000).

Os primeiros vírus de Archaea foram descobertos na família *Haloarchaea*. Posteriormente, foram identificados 16 vírus de Archaea morfologicamente diferentes e geneticamente únicos, que foram classificados em 15 famílias: *Ampullaviridae, Bicaudaviridae, Clavaviridae, Fuselloviridae, Globuloviridae, Guttaviridae, Pleolipoviridae, Spiraviridae, Rudiviridae* e *Lipothrixviridae*, subdividido, por sua vez, em *alpha, beta, gamma e delta* (BOUNDLESS MICROBIOLOGY, 2016). Além das famílias *Siphoviridae, Myoviridae* e *Podoviridae* que são capazes de infectar organismos dos domínios Bacteria e Archaea (CAVICCHIOLI, 2011; PIETILÄ et al., 2014).

1.5 Metagenômica

O termo metagenômica foi pela primeira vez empregado por Handelsman et al. em 1998. Essa metodologia refere-se a uma abordagem que nos permite acessar a diversidade biológica e química da vida, em um determinado nicho, pela obtenção de qualquer material genético, sem a necessidade de cultivo prévio dos organismos e sem a necessidade de utilização de *primers* específicos (GIMENES, 2010).

Ao longo dos anos, o termo metagênomica vem incorporando novos significados sendo referida como genômica de comunidades, ecogenômica ou genômica ambiental. Petrosino et al. (2009) recentemente apresentaram a seguinte definição de metagenômica:
"Metagenômica se refere a estudos cultivos-independentes de um conjunto coletivo de genomas de comunidades microbianas mistas, e se aplica a explorações de todos os genomas microbianos presentes em populações que residem em nichos ambientais, plantas, ou hospedeiros animais".

Nas últimas décadas, o estudo da diversidade de comunidades microbianas, e consequentemente, da pesquisa de vírus, sofreu uma revolução com o estabelecimento da metagenômica, já que essa técnica detectou micro-organismos que habitam diferentes ambientes do nosso planeta e do nosso corpo. Muitos destes micro-organismos não haviam sido isolados em meio de cultura em laboratório (RODRIGUES, 2008).

As informações obtidas a partir da análise de metagenomas podem ser usadas para identificar a diversidade de uma comunidade, a presença de micro-organismos específicos ou dominantes, suas rotas metabólicas, bem como um gene especifico (RODRIGUES, 2008).

Tendo em vista a dificuldade encontrada na pesquisa de vírus por técnicas convencionais, a técnica de sequenciamento possibilitou um avanço nas pesquisas do genoma dos micro-organismos, já que possui alto rendimento para o estudo dos vírus no ambiente natural. De fato, os vírus encontram-se entre os melhores candidatos a serem estudados por sequenciamento metagenômico, já que eles possuem genoma pequeno, ácido nucleico, e capsídeo que tolera os protocolos de tratamento das amostra para a concentração de vírus e purificação do DNA e RNA (RAY et al., 2012).

No entanto, o avanço dos conhecimentos na área da ecologia viral está comprometido por causa da dificuldade de se encontrar técnicas que possibilite o estudo dos vírus experimentalmente, bem como a falta de ferramentas de bioinformática para classificar e quantificar sequências virais em amostras ambientais (RAY et al., 2012).

A metagenômica também tem desvantagens. Em primeiro lugar, existe uma grande diversidade de vírus em amostras de água, o que complica a montagem e anotação dos genomas obtidos e, em segundo lugar, resulta em poucos genomas completos montados (RAY et al., 2012).

Atualmente, a metagenômica viral tem permitido vislumbrar melhor a complexidade de vários ecossistemas, não somente pela descoberta de novos vírus, como também pelo aumento do nosso conhecimento sobre a diversidade e ecologia viral. Nos estudos atuais está bem estabelecido que os vírus, tanto de RNA quanto de DNA, estão presentes em ambientes aquáticos e, portanto, é importante conhecer os vírus e seus impactos nesses ambientes, bem como na estruturação das comunidades ao seu redor (DJIKENG et al., 2009).

Aproximadamente 75 % das sequências obtidas em estudos metagenômicos virais não apresentam correspondência com quaisquer genes da base de dados *nr* (não redundante) do banco de dados mundial *GenBank*, sugerindo que a maioria da diversidade viral permanece ainda não caracterizada, fator muito relevante, já que as comunidades virais são as mais diversas entre todas as entidades biológicas estudadas até o momento (BREITBART; ROHWER, 2005).

O conceito surgiu da ideia de se explorar melhor os micro-organismos do solo que não eram cultivados em laboratórios e também os compostos químicos que eles produzem. De fato, muitas evidências apontam que apenas 0,1 % dos micro-organismos presentes no solo são cultiváveis em laboratório. Por outro lado, esses micro-organismos são potencialmente uma grande fonte de estudos de antibióticos e outros agentes medicinais importantes na saúde humana. A saída para elucidar essa enorme diversidade do bioma foi a metagenômica (GIMENES, 2010).

Ou seja, aproximadamente 99 % dos organismos não são cultiváveis em laboratório, logo, a metagenômica surgiu como uma ferramenta que pode transcender essas limitações técnicas, além de nos permitir estender nossos conhecimentos muito além do escopo laboratorial. Isso nos permite, assim, entender melhor as relações evolucionárias e a estruturação da biodiversidade em um dado ambiente (VENTER et al., 2004).

Em 2004, o J. Craig Venter Institute publicou os resultados de um projeto de metagenômica ambiental nunca antes realizado em tão larga escala. Neste estudo coletou-se amostras em três locais diferentes na Costa da Bermuda, região conhecida como Mar de Sargaços, aproximadamente 1 bilhão de pares de bases de sequências não redundantes foram geradas, anotadas e analisadas para elucidar a abundância, diversidade e o conteúdo gênico dessas regiões (VENTER et al., 2004).

Esses dados foram derivados de mais de 1.800 micro-organismos, além de terem fornecido informações sobre 148 filotipos de bactérias não documentados anteriormente. Na área da Virologia, os estudos metagenômicos, a partir de ambientes aquáticos, vêm sendo uma importante ferramenta de caracterização das populações e suas distribuições em todo planeta. Diversos estudos vêm sendo realizados desde meados do ano 2000 (BREITBART et al., 2004; VENTER et al., 2004).

As informações biológicas dos micro-organismos estudados são adquiridas através de processos moleculares específicos, como, por exemplo, a PCR (Reação da Cadeia da Polimerase). Isto ocorre porque existem organismos cujos genomas ou transcriptomas já estão montados e, consequentemente, tornando possível encontrar uma região específica ou sequência codificante através de buscas de similaridade com programas como o BLAST. Por outro lado, existem aqueles organismos cujos dados de sequenciamento ainda se encontram fragmentados, então é necessário uma montagem global do genoma/transcriptoma para se identificar o organismo de estudo (SOBREIRA; GRUBER, 2008).

A exploração de dados de metagenômica ambiental para o levantamento de vírus conhecidos e ainda desconhecidos pode contribuir para uma melhor compreensão do papel desses vírus na dinâmica de uma comunidade em estudo (SOBSEY; MESCHKE, 2003).

1.6 Histórico de estudos de vírus ambientais

Vários estudos de ecologia de vírus no ambiente aquático foram realizados ao longo dos últimos anos.

Em 1970, o primeiro estudo analisou a relação dos vírus com o fitoplâncton seguido pelos estudos de Wommack; Hill; Kessel (1992) que coletaram amostras de água da Baía de Chesapeake, nos anos de 1990 e 1991, e analisaram a interação dos vírus com seus hospedeiros. Posteriormente, a distribuição de vírus no Mar Adriático do Norte foi verificada por Weinbauer; Fuks; Peduzzi (1993) e por Weinbauer; Peduzzi (1994) e em 1995, MATHIAS; KIRSCHNER; VELIMIROV que analisaram a abundância de partículas semelhantes a vírus no rio Danúbio.

O virioplâncton foi alvo dos estudos na Baía de Chesapeake e no estuário Charente (rio Charente) em 1999 e em 2005 (AUGUET et al. 2005;WOMMACK et al., 1999). Auguet et al. verificaram que as condições hidrodinâmicas influenciam na distribuição e abundância do virioplâncton da região, especialmente durante a estação de inverno.

Em 2004, Bettarel et al. verificaram que a mortalidade de bactérias, em um período de 10 meses, nos lagos Pavin e Aydat, na França, foi provocada por vírus. Em 2009, a relação entre viroplâncton e a comunidade bacteriana no lago Pavin na França foi estudada por Colombet et al. .

Estudo iniciais de fagos provenientes de ambientes marinhos foram conduzidos por Filée et al. (2005) e por Short; Suttle (2005) que, além do ambiente marinho, estudou os fagos no ambiente de água doce.

Em 2006, Jiao et al. verificaram que a maioria da abundância viral total (6,75 $x10^5$ de vírus/ml), que ocorreu no rio Yangtze, entre 2002 e 2003 e depois no estuário e na jusante do rio em 2005, era de bacteriófagos e apenas 5,4 % dos vírus totais encontrados era proveniente de vírus de algas.

A presença de vírus em ambientes extremos na Antártica Oriental foi verificada por Säwström et al. (2007) nos lagos antártico de água doce ultraoligotróficos, gelados e pobres em nutrientes, Druzhby e Crooked, em um ciclo anual de 2003 até 2004.

Um estudo relevante utilizando técnicas moleculares foi realizado por Clasen; Suttle (2009) que identificaram membros da família *Phycodnaviridae* em água doce e marinha e seus potenciais hospedeiros fitoplânctonicos. As análises revelaram que as sequências de nucleotídeos obtidas pertencem a distintos grupos filogenéticos, cujas diferenças observadas nas sequências de aminoácidos foram acima de 7 %.

O estudo de Thomas et al. (2011), que teve como objetivo a ecologia dos vírus no Lago Bourget (França) em 2008, demonstraram a importância quantitativa e funcional de virioplâncton na rede alimentar aquática. Em torno de 3,4 a 8,2 X 10^7 partículas semelhantes a vírus/ml foram identificados por microscopia eletrônica na amostra analisada e encontraram

entre 0 a 71 % de mortalidade bacteriana causada por vírus, contribuindo assim com a dinâmica nutricional do lago.

Parsons et al. (2012) demonstraram que existe relação dos padrões sazonais e a dinâmica de virioplâncton no mar noroeste dos Sargazos, entre a América do Norte e Europa. Pan et al. (2017) verificaram que a abundância de vírus e os parâmetros biogeoquímicos em ambientes subterrâneos estão correlacionados, assim como, a interação dos fagos com as bactérias num ambiente ideal anaeróbico (ZHANG et al. (2017).

Hakspiel-Segura et al. (2017), observaram uma dinâmica espacial e temporal de virioplâncton, em amostras coletadas entre 2004 e 2005, em altitudes elevadas no Reservatório El Neusa (Cundinamarca, Colômbia) e uma possível relação negativa em relação à particulas virais *versus* biomassa média por célula bacteriana.

No Brasil, alguns estudos já foram realizados na tentativa de elucidar a interação do virioplâncton no ambiente aquático.

Os fatores de controle da dinâmica de virioplâncton foram investigados por Pereira et al. (2009) em diferentes massas de água na região do Arraial do Cabo, Rio de Janeiro. O estudo revelou que o fenômeno da ressurgência desta região foi o principal fator contribuinte para os maiores valores de abundância viral e da relação vírus-bactéria. Em outro estudo na mesma região, Barbosa et al. (2016) avaliaram abundância viral e a relação com seus vários hospedeiros no meio ambiente de cinco pontos, incluindo áreas de ocupação humana. Os resultados apontaram para uma relação positiva entre bactéria, clorofila A e vírus. Além disso, foram observadas evidências claras de que existe uma influência sazonal entre as variáveis bióticas e abióticas de Arraial do Cabo, existindo uma alta correlação entre abundância de vírus e a forma inorgânica de nitrogênio. Dados semelhantes foram obtidos por Cabral et al. (2017) na baía de Guanabara, que analisaram a dinâmica do virioplâncton em ambiente eutrofizado, próximo a região urbana tropical do Rio de Janeiro. Além da correlação positiva entre bactéria, clorofila A e vírus, foi observado que a abundância bacteriana e viral foi correlacionada positivamente com a eutrofização especialmente nas águas superficiais.

Em outro estudo, Junger et al. (2017) avaliaram 20 lagoas tropicais costeiras do Rio de Janeiro, na região do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba. Fatores de variáveis ambientais como turbidez, carbono orgânico, salinidade, presença de bactérias e vírus foram analisados. Os pesquisadores verificaram uma ocorrência de abundância positiva em relação às bactérias heterotróficas e a salinidade. A abundância de vírus variou de 0,37 a 117 x 10^8 partículas de vírus/ml^{-1} em sistemas aquáticos altamente salgados e foi regulada pela presença bacteriana e concentração de fósforo total.

Em outro estudo, Gimenes (2010); Gimenes et al. (2012) analisaram a diversidade dos vírus das famílias *Phycodnaviridae* e *Myoviridae* nos rios da região amazônica, Negro, Solimões e Cuieiras, região norte do Brasil, utilizando ensaios moleculares e metagenômica. A presença de *Phycodnaviridae* foi detectada apenas nas amostras dos rios Solimões e Cuieiras. Além disso, verificou-se um fluxo gênico entre os ambientes lóticos e lênticos, e de ambientes marinhos para ambientes de água doce.

2 OBJETIVO

2.1 Geral

Caracterizar os vírus autóctones e alóctones presentes em águas de manancial e de esgoto contaminado por lançamento de esgoto na região metropolitana de São Paulo utilizando análise metagenônica.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a eficiência de diversos métodos de purificação de concentrados virais e de extração de DNA viral oriundos de águas de esgoto com vistas à análise metagenômica.
- Caracterizar a diversidade viral em águas de manancial e de esgoto por análise metagenômica

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Ensaios para padronização da metodologia

3.1.1 Amostras ambientais

Amostras de água de esgoto disponíveis no Laboratório de Virologia Entéricos Humanos e Animais (LVEHA) coletadas e processadas em diferentes períodos foram utilizadas nos presentes ensaios.

3.1.1.1 Água de esgoto do da ETE ABC

A água de esgoto da ETE ABC é oriunda da região de Santo André, São Bernardo do Campo e São Caetano do Sul, Mauá, Ribeirão Pires, Rio Grande da Serra e Diadema. Esses municípios juntos formam uma área de 825 Km^2 com uma população de mais de 2,5 milhões de habitantes.

Um total de 177 amostras, coletadas semanalmente nos anos 2005 a 2006, foram agrupadas em 8 *pools*, sendo cada *pool* formado por 100 µL das amostras equivalentes a três meses de coletas (tabela 1).

3.1.1.2 Esgoto da Estação Elevatória do Parque Edu Chaves

As amostras de esgoto da Estação Elevatória (EE) do Parque Edu Chaves foram coletadas e processadas mensalmente em 2002 e a mistura de 100 µL de cada uma dessas amostras formam um *pool* com 6 amostras, ou seja, seis meses de coleta (tabela 1).

Edu Chaves é um bairro da Cidade de São Paulo situado à margem do Rio Cabuçu de Cima, junto a Rodovia Fernão Dias. O afluente era composto por água de esgoto oriundo de bairros da Zona Norte de SP como Tremembé, Vila Maria, Vila Medeiros, Jaçanã e Edu Chaves.

3.1.1.3 Esgoto de Barueri

Uma amostra de água de esgoto (4 L) oriunda da ETE Barueri foi coletada e processada no ano de 2014 (tabela 1). A cidade de Barueri possui uma estação de tratamento

de esgoto que atende as cidades de Jandira, Itapevi, Barueri, Carapicuíba, Osasco, Taboão da Serra e partes de Cotia e Embu.

Tabela 1 - Amostras de água de esgoto concentradas pertencentes à coleção do LVEHA e utilizadas no presente estudo.

Tipo de água/Local	***Pool***	**Data de coleta**	**Volume de amostra processado (Litros)**	**Quantidade de amostras em cada *pool***	***Total de Pools***
Esgoto da ETE ABC	(*pool* 1)	2005	15	22	8
	(*pool* 2)			20	
	(*pool* 3)			25	
	(*pool* 4)			21	
	(*pool* 5)	2006	15	23	
	(*pool* 6)			25	
	(*pool* 7)			24	
	(*pool* 8)			20	
Esgoto da EE do Pq. Edu Chaves		2002	15	6	1
Esgoto da ETE Barueri		2014	4	1	1

3.1.2 Processamento das amostras

3.1.2.1 Águas de esgoto do ABC e de EE do Pq. Edu Chaves

As amostras dos efluentes domésticos do ABC e de EE do Pq. Edu Chaves não foram processadas no presente trabalho, elas já faziam parte do banco de amostra do laboratório. Foram concentradas por filtração seguindo o método descrito por Mehnert et al. (1997). Portanto as amostras utilizadas no presente estudo correspondem aos concentrados virais.

3.1.2.3 Amostra de esgoto de Barueri

Os 4 L da amostra de água do esgoto de Barueri foram processados seguindo o método descrito por Mehnert et al. (1997). Esse método consiste em filtrar a amostra através de membrana eletropositiva Zeta Plus 60 (AMF, Cuno DIV, Meridenn, Conn.) e um pré-filtro AP-20 em microfibra de vidro (Millipore Corp. Belford, Mass). Após a filtração. as partículas virais adsorvidas foram eluídas com 100 mL de Extrato de Carne (Difco ® - Lawrence,. Kansas, EUA) a 3 % pH 9 e o pH final da amostra ajustado para 7,0 com solução de HCL 1N.

Após o tratamento com Vertel XF™ o sobrenadante foi novamente ultracentrifugado a 100.00 xg. O sedimento uriundo da ultracentrigação foi ressuspenso em tampão 1 mL de TE 1X (1 M Tris-HCL + 0,1 M EDTA, pH 8,0) e estocado a -20 ºC até o momento de uso.

O volume de 1 mL resultante da ultracentrifugação foi dividido em duas alíquotas de 500 µL, sendo uma alíquota para a extração de DNA por Trizol e a outra alíquota para a extração seletiva do DNA pelo método de Hirt (1967).

3.1.3 Estabelecimento dos processos de purificação das amostras para análise metagenômica

3.1.3.1 Tratamento com DNAse do esgoto de Barueri

As duas alíquotas de 500 µL do concentrado viral do esgoto de Barueri (item. 3.1.2.3) foram misturadas com 3 µL de DNAse (Invitrogen® - Carlsbad, Califórnia, EUA) e incubadas a 37 ºC por 15 min. Após este período, a enzima foi inativada pela adição de 3 µL de EDTA (25 mM) e incubação a 65 ºC por 10 min. A amostra foi estocada a -20 ºC até o momento de uso.

3.1.3.2 Purificação por filtração, Protease e Clorofórmio

As amostras concentradas de esgoto da EE do Pq. Edu Chaves (item. 3.1.2.1) foram diluídas em 3 mL de tampão fosfato 1M pH 7,5 e filtradas através de membrana Millipore® 0,22 µ de porosidade. Após a filtração foi separada uma alíquota de 500 µL de cada amostra e em seguida tratada com DNAse (Invitrogen®) conforme descrito no item 3.1.3.1. Após esse procedimento foi adicionado à amostra 10 µL de protease (Thermo® - Thermo Fisher Scientific, São Paulo, SP, Brasil) e a amostra foi incubada a 56 ºC por 1 h. Em seguida foram adicionados 500 µL de Clorofórmio (Merck® - Merck S.A., Rio de Janeiro, RJ., Brasil)), a mistura foi agitada em vortex e então centrifugada a 4.000 xg por 15 min. O sobrenadante foi estocado a -20 ºC até momento de usá-lo na extração item 3.1.4.

3.1.4 Avaliações de métodos de extração de DNA para aplicação metagenômica

Foram testados vários métodos de extração de DNA e o desempenho destes comparado em relação a concentração de DNA e pureza das amostras extraídas.

3.1.4.1 Extração Trizol e clorofórmio

3.1.4.1.1 Extração de DNA

A extração por Trizol (Invitrogen®) e clorofórmio (Merck®) do DNA foi realizada nos 8 *pools* de esgoto do ABC, na primeira alíquota de 500 µL de Barueri, nos dois *pools* da amostra de esgoto de Taboão da Serra e São Lourenço da Serra, como também nos dois *pools* das amostras da represa do Guarapiranga e São Lourenço da Serra.

Uma alíquota de 300 µL da amostra foi misturada a 900 µL de Trizol® (Thermo®) e após agitação vigorosa, incubada em temperatura ambiente por 5 min. Em seguida foram acrescidos 240 µL de clorofórmio (Merck®), nova agitação por 15 seg. e incubação por 3 min. em temperatura ambiente.

Passado esse tempo a amostra foi centrifugada a 4.000 xg por 15 min. a 4 ºC. A fase aquosa (superior) foi separada, e à fase fenólica (inferior) foram adicionados 300 µL de etanol absoluto. A mistura foi novamente agitada vigorosamente por 3 min. e em, seguida centrifugada a 2.000 xg por 15 min. a uma temperatura de 4 °C. O sobrenadante foi desprezado e o pellet foi lavado com 500 µL de citrato de sódio (0,1 M) + 10 % etanol.

O sedimento foi diluído com 1,5 mL de etanol 75 %, e após incubação por 20 min. em temperatura ambiente, foi centrifugada a 4.000 xg por 5 min. a 4 °C. Após a evaporação do álcool o sedimento foi resuspenso em água ultrapura e conservado a -20 ºC.

3.1.4.1.2 Extração de RNA

A extração de RNA dos 8 *pools* esgoto do ABC e do esgoto de Barueri foram realizado utilizando o Trizol (Invitrogen®) e clorofórmio (Merck®).

As fases aquosas obtidas no procedimento do item 3.1.4.1.1, foram acrescidas de 600 µL de álcool isopropílico. Essa mistura foi incubada por 10 min. em temperatura ambiente e em seguida foi centrifugada a 6.000 xg por 15 min. a 4 °C. O sedimento foi lavado com 900 µL de etanol 75 %. A seguir, a mistura foi centrifugada a 5.000 xg por 15 min. a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento exposto à temperatura ambiente para evaporação do álcool. A amostra foi eluída em 50 µL de água DEPC 0,01 % (Dietilpirocarbonato – Sigma®) e estocada a -20 ºC até o momento de uso.

3.1.4.1.2.1 Síntese de cDNA

Os RNAs extraídos pelo método Trizol - clorofórmio (item 3.1.4.1.2) foram transcritos a cDNA por reação de transcrição reversa, utilizando *primer* randômico (*Random Hexamers primer*, Invintrogen®).

A síntese foi realizada de acordo com as instruções do fabricante, sendo utilizados 10 µL de RNA, 0,5 µg/ µL de *random primer*. Os ciclos aplicados foram 25 ºC por 10 min., 37 ºC por 50 min. e 70 ºC por 15 min.

3.1.4.2 Método de Hirt - extração seletiva de DNA viral

O método da extração seletiva de DNA viral descrita por Hirt (1967) foi testada na segunda alíquota da amostra de Barueri e nas de água de esgoto do ABC.

Um volume de 500 µL de cada amostra foi misturado com 30 µL de SDS 10% e incubado por 10 min. a temperatura ambiente e então foram adicionados 5 µL de Proteinase K (Invitrogen®). A amostra foi então incubada por 1 h a 60 ºC.

Após essa etapa foram adicionados cuidadosamente 150 µL de NaCl 5 M, agitando suavemente a mistura por 10 min. Essa mistura foi incubada por 18 h a 4 ºC. Após este período, a amostra foi centrifugada a 4.000 xg. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL, adicionados 5 µL de proteinase K (Invitrogen®) e a mistura incubada por 2 horas a 60 ºC. Após essa etapa foi realizada a extração com fenol-clorofórmio conforme descrito no item 3.1.4.1.

3.1.4.3 Power Soil DNA isolation kit

A extração de DNA com o *Power Soil DNA isolation* kit (MOBIO Laboratories® - Carlsbad, CA, EUA) foi baseado na aplicação anterior por Gimenes et al. (2011). Para este ensaio foram usadas diversas alíquotas: amostra de água de esgoto concentrado da EE do Pq. Edu Chaves semeada experimentalmente com Adenovírus padrão, Adenovírus padrão previamente diluído em Tampão fosfato (PBS) 1M pH 7,5, água de esgoto concentrado EE do Pq de Edu Chaves e água de esgoto de Edu Chaves concentrada previamente diluída 1:6 em PBS 1 M pH 7,5.

As extrações foram realizadas segundo as instruções do fabricante. As amostras foram estocadas a -20 ºC até momento de uso.

3.1.4.4 DNeasy Blood and Tissue Kit

A aplicação do DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen® - São Paulo, SP, Brasil) foi baseada em estudo de Cantalupo; Calgua; Zhao (2011). Uma alíquota de 200 µL de esgoto concentrado da EE Pq. Edu Chaves semeada experimentalmente com Adenovírus padrão foi usada no teste. Concomitantemente foram testadas alíquotas de Adenovírus padrão diluído em Tampão fosfato 1 M pH 7,5, do esgoto de Edu Chaves concentrada original e diluída previamente (1:5) em PBS 1 M pH 7,5.

As amostras foram extraídas segundo as instruções do fabricante e estocadas a -20 ºC até momento de uso.

3.1.5 Amplificação do DNA extraído

O kit *illustraTM Single Cell GenomiPhiTM DNA Amplification* (GE Healthcare - Amersham, Dharmacon, Inc.Biacore) foi usado para amplificar o DNA extraído e purificado por diversas metodologias (item 3.1.3) conforme apresentado por Mizuno et al (2013).

Para a amplificação do DNA extraído foi utilizado 1 µL de DNA e 1 µL do tampão de lise do kit. Após esse tempo adicionou-se a essa mistura 1 µL do tampão neutralizante. A amplificação propriamente dita foi realizada com 11 µL de tampão de reação do kit, 1 µL de enzima 4 µL de água esterilizada,1 µL do reagente de amplificação do próprio kit e os 3 µL originadas da primeira parte da reação. O total de 20 µL de amostra foi incubada a 65 ºC por 10 min.

3.1.6 Quantificações do DNA, cDNA e RNA

3.1.6.1 Método espectrofotométrico - NanoDrop 2000c

Todas as amostras de DNA, cDNA e RNA obtidas conforme descrito no item 3.1.4 foram quantificadas utilizando o equipamento NanoDrop 2000c. Uma alíquota de 1 µL de cada amostra de DNA e RNA foi depositada no NanoDrop 2000c e a concentração de ácido nucleico estabelecida por leitura a 260 nm. Uma segunda leitura a 280 nm estabelece a concentração de proteína residual. Os resultados foram expressos em µg/mL e a pureza definida pela razão dos valores obtidos para cada comprimento de onda (260/280).

3.1.6.2 Método fluorimétrico - Qubit 2.0

Para a quantificação do DNA foi utilizado o equipamento Qubit 2,0 (Invitrogen by Life Technologies) disponível no Centro de Facilidade de Apoio à Pesquisa (Cefap) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB IV). Foi utilizado o kit *dsDNA HS Assay* (Life Technologies) para o preparo da amostra, seguindo instruções do fabricante. Para a quantificação do DNA foi utilizado 1µL do DNA, 1 µL do fluoroforo em 198 µL de tampão específico do kit. Os resultados foram expressos em ng/µL.

3.1.7 Montagem da biblioteca genômica e sequenciamento por Miseq

Após a quantificação dos DNAs (itens 3.1.4) a amostra de água de esgoto de Barueri foi selecionada para o preparo da biblioteca de DNA para posteriormente ser sequenciada no Miseq no Centro de Facilidades de Apoio à Pesquisa no instituo de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEFAP - USP).

3.1.7.1 Analises das reads

Para a análise das *reads* gerados pelo sequenciamento foi utilizado o programa fastQC versão 0.11.5 (ANDREWS, 2016)

3.1.7.2 Montagem dos contigs

Após trimar as *reads* e os *contigs* foram montados e avaliados usando o programa CLC Workbench software (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Denmark).

3.1.7.3 Construção dos gráficos

Os *contigs* gerados após a montagem foram comparados as sequencias depositadas no GenBank, utilizando o blastx do programa BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990). Para a construção dos gráficos foi utilizado o programa Megan 6 versão 6.4.19 (HUSON, 2015).

3.2 Avaliação da diversidade viral em amostras de água de manancial e esgoto

3.2.1 Origens das amostras

Com base nos ensaios realizados com as amostras disponíveis no LVEHA foram coletadas e processadas novas amostras de campo. Estas amostras oriundas de mananciais e de esgotos foram coletadas pela CETESB de janeiro a dezembro de 2013, na Represa Guarapiranga, no esgoto de Taboão da Serra, na estação de tratamento de São Lourenço da Serra e na estação de esgoto de São Lourenço da Serra como parte de um projeto multidisciplinar para avaliação de patógenos entéricos humanos em mananciais de São Paulo (Projeto Fapesp Número do Processo: 2010/50797-4) utilizando métodos bacteriológicos, virológicos e parasitológicos convencionais e moleculares.

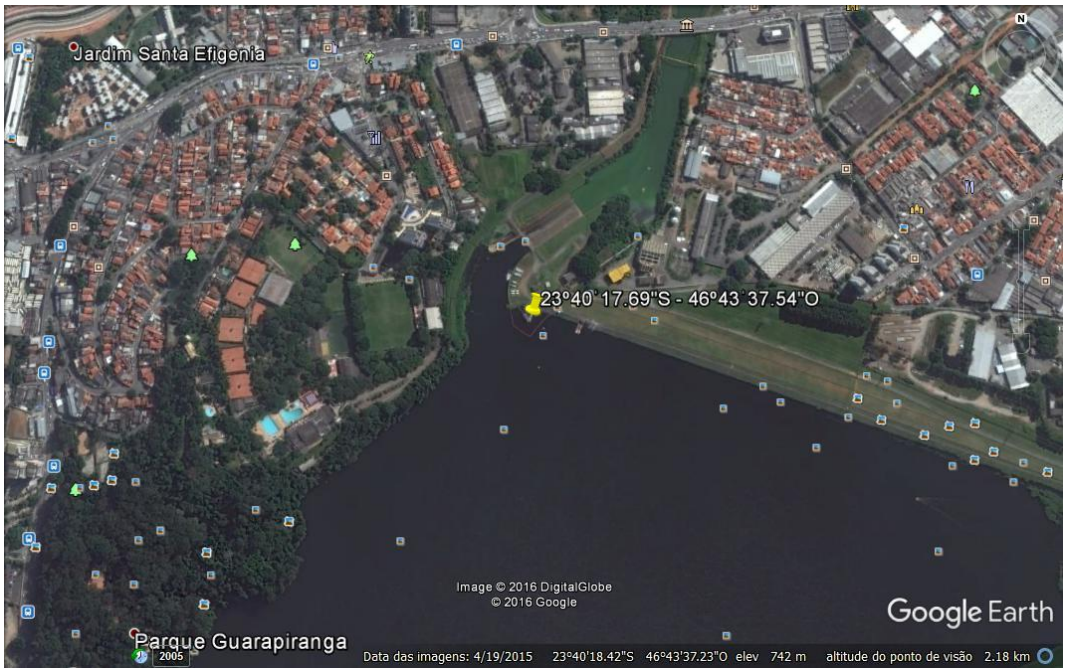
3.2.1.1 Localização dos Mananciais e dos Esgotos

A localização dos pontos de coletas, de acordo com *Google Earth* versão 7.1.8.3034 (EARTH-MAPAS, 2016), é 23º51'7.82"S - 46º56'38.97"O Água bruta superficial da Estação de Tratamento de Água (ETA) de São Lourenço da Serra (figura 12) e 23º40'17.69"S - 46º43'37.54"O da Água bruta superficial do Represa Guarapiranga, próximo da barragem junto da captação (figura 13).

Figura 12- Estação de tratamento de água (ETA) de São Lourenço da Serra.

Fonte: Google Earth, (2016).

Figura 13- Reservatório Guarapiranga.



Fonte: Google Earth, (2016).

O ponto de coleta do esgoto bruto da cidade de São Lourenço da Serra está localizado em 23º51'23.78"S – 46º57'17.13"O (figura 14) dentro de uma Estação de Tratamento de

Esgoto (ETE) e a localização do ponto de coletada do esgoto bruto de Taboão da Serra é 23º36'24.93S - 46º46'4.27"O (figura 15) – Centro (EARTH-MAPAS, 2016).

Figura 14- Estação de tratamento de esgoto (ETE) do município de São Lourenço da Serra

Fonte: Google Earth, (2016).

Figura 15- Ponto de coleta do esgoto do município de Taboão da Serra

Fonte: Google Earth, (2016).

3.2.2 Concentração das amostras

3.2.2.1 Coleta

Foram coletados 80 L de água da Represa Guarapiranga e 80 L de água da Estação de Tratamento de Água de São Lourenço da Serra (ETA), como também 15 L de esgoto oriundas dos municípios de Taboão da Serra e 15 L de esgoto da Estação de Tratamento de Esgoto São Lourenço da Serra (ETE), quinzenalmente ao longo de 2013, perfazendo 25 amostras por ponto, ou seja, 100 amostras no total.

3.2.2.2 Adsorção-eluição por filtração

As amostras foram submetidas à medição do pH e, quando necessário, foram ajustadas para o pH 6,5 utilizando ácido clorídrico-HCl (1N). As amostras de água e as amostras de esgotos foram concentradas utilizando a filtração, como descrita por Mehnert et al. (1997).

A técnica descrita por Mehnert et al. (1997) consiste em um aparelho de filtração em aço inoxidável com 293 mm (Millipore Corp. Belford, Mass.), acoplado a uma bomba de pressão que utilizada um pré-filtro, AP-20 (Millipore Corp. Belford, Mass), composto de microfibra de vidro, 140 mm de diâmetro, porosidade de 0,45 mm e de uma membrana Zeta Plus 60S (AMF, Cuno Div., Meriden, Conn.) carregada positivamente. Após a amostra ser submetida à filtração foram adicionados 100 mL de extrato de carne (Difco®) a 3 % (0.05M de Glicina) com pH 9,0 à membrana Zeta Plus 60S. Depois de 10 min., o extrato foi filtrado duas vezes e imediatamente neutralizado com HCl (1N) até atingir um pH de 7,0. A amostra foi acondicionada em frasco esterilizado e congelada a -20 ºC até o momento do uso.

3.2.3 Ultracentrifugação

As amostras eluídas no extrato de carne foram reconcentradas por ultracentrifugação 100.000 *xg* usando uma ultracentrifuga L8 -70M (Beckman®) e um rotor SW-28 por 2 h a 4 ºC. O sobrenadante foi cuidadosamente desprezado e o sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão fosfato 1M pH 7,5, (MEHNERT; STEWIEN, 1993).

3.2.4 Tratamento do concentrado viral

3.2.4.1 Vertrel XF™

Após a concentração da amostra foi realizado o tratamento com Vertrel XF™ (DuPont®), segundo Queiroz et al. (2001). O Vertrel XF™ foi adicionado a amostra em proporção igual (v/v) a amostra. Em seguida, a mistura foi homogeneizada em um agitador mecânico por 5 min. e centrifugada a 4.000 xg por 10 min. em centrífuga para micro tubos Eppendorf® e em temperatura ambiente. O procedimento foi repetido 3 vezes ou mais, quando necessário e em seguida, a amostra foi tratada com antibióticos (1.000 UI de penicilina por mL e 1.000 µg de estreptomicina por mL). O sobrenadante foi estocado a -20 ºC até o momento de uso.

3.2.4.2 Filtração

Para retirar bactérias e outros contaminantes da amostra e após o tratamento com Vertrel XF™ a amostra foi diluída na proporção de 1:5, para isso utilizou-se 3 mL de tampão fosfato 1 M pH 7,5 e em seguida filtrada através de membrana Millipore® 0,22 µm de porosidade (CANTALUPO et al., 2011).

3.2.4.3 DNAse

Após a filtração foi separada uma alíquota de 500 µL de cada amostra e misturada com 3 µL de DNAse (Invitrogen) e incubada a 37 ºC por 15 min. A enzima foi inativada pela adição de 3 µL de EDTA (25 mM) e novamente incubada a 65 ºC por 10 min. Este procedimento foi utilizado para retirar o material genético oriundo do rompimento de membranas celulares, ocasionado pelos tratamentos descritos anteriormente (CANTALUPO et al., 2011).

3.2.4.4 Protease e Clorofórmio

Para a retirada de proteínas oriundas das células rompidas foi adicionado à amostra 10 µL de protease (Thermo®) e a amostra incubada a 56 ºC por 1 h. Em seguida foram

adicionados 500 µL de Clorofórmio (Merck®) e a mistura foi agitada em vortex e então centrifugada a 4.000 xg por 15 min. O sobrenadante foi estocado a -20 ºC até o momento de uso (CANTALUPO et al., 2011).

3.2.5 Extração do DNA

Após a amostra ter passado pelos tratamentos descritos (itens 3.2.4.1, 3.2.4.2, 3.2.4.3 e 3.2.4.4) o DNA viral foi extraído utilizando o *DNeasy Blood and Tissue Kit* (Qiagen®) baseada no estudo de Cantalupo et al. (2011) e nos resultados preliminares obtidos no presente estudo.

A extração foi realizada segundo as instruções do fabricante. As amostras foram estocadas a -20 ºC até momento do uso.

3.2.6 Quantificação do DNA

3.2.6.1 Método fluorimétrico

A quantificação do DNA foi realizada com o equipamento Qubit® 2,0 disponível no Centro de Facilidade de Apoio à Pesquisa (Cefap) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB - IV). Fluorometer foi utilizado o kit *dsDNA HS Assay* (Life Technologies) para o preparo da amostra, conforme descrito no item. 3.1.6.2. Os resultados foram expressos em ng/uL.

3.2.7 Amplificação do DNA extraído

O DNA das amostras foram amplificados utilizando o kit *illustra™ Single Cell GenomiPhi™ DNA Amplification* da GE Healthcare conforme descrito por Mizuno et al. (2013). Os procedimentos foram apresentados em detalhe no item 3.1.5

3.2.8 Analise de Metagenômica

3.2.8.1 Sequenciamento de nova geração Illumina®

O processo de preparo da amostra e análise metagenômica foi realizado segundo Solonenko et al. (2013) com o objetivo de gerar sequências paired end de 100 pb. O

sequenciamento foi realizado com aparelho Hiseq 2500 System da Illumina da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz (ESALQ) da Universidade de São Paulo (USP) de acordo com as orientações descritas no kit *Nextera XT DNA Library Preparation Kit* (Illumina®, Inc.).

3.2.8.2 Análise da qualidade das reads

Para a análise da qualidade das *reads* geradas pelo sequenciamento foi utilizado o programa FastQC, versão 0.11.5 (ANDREWS, 2016).

Os resultados das análises do FastQC foram visualizados em arquivos no formato HTML. Após a análise de qualidade foram removidos os adaptadores Illumina, utilizados para ancoragem dos *primers* de sequenciamento.

Os adaptadores *Nextera transposase sequence* detectados através do FastQC foram removidos utilizando o programa cutadapt versão 1.13 (MARTIN, 2011) nos parâmetros: "-q 30 -a CTGTCTCTTATACACATCT--minimum-length 50--overlap=5 -u 2".

3.2.8.3 Montagem e análise dos contigs

Os *contigs* foram montados, usando o programa CLC Workbench software (CLC Bio-Qiagen, Aarhus, Denmark) e avaliados utilizado o programa FastQC (ANDREWS, 2016).

Foi utilizado o blastx do programa BLAST (*The Basic Local Alignment Search Tool*) (ALTSCHUL et al., 1990) para encontrar similaridades entre as sequências montadas dos vírus, traduzidas nas seis fases de leitura possíveis, contra as sequências de peptídeos das proteínas dos vírus de Eukaryota, Bacteria e Archaea presentes no banco de dados nr (*nonredundant*) do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) (http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

As sequências analisadas no blastx foram comparadas através do programa Megan 6 version 6.4.19 (HUSON, 2015), para a construção dos gráficos dos *contigs*.

3.2.9 Caracterização fisico-química e biológica das amostras de água e esgoto

As amostras de água de manancial e de esgoto foram caracterizadas físico-quimicamente através do monitoramento dos parâmetros de turbidez, pH e temperatura e biologicamente através das contagens de *Escherichia coli*, para contaminação fecal, e

fitoplâncton. Estas análise foram realizadas no âmbito do Projeto Fapesp “Modelo de estudo para avaliar o impacto de patogenos entericos em mananciais de abastecimento publico” (Processo: 2010/50797-4) nos laboratórios da Companhia Tecnologica de Saneamento Ambiental (CETESB) segundo recomendações do Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (APHA, 2012).

A análise de fitoplâncton foi realizada em abril de 2013 nas águas da respresa Guarapiranga contando com auxilio de bióloga Beatriz Viana da SABESP.

A análise foi realizada a fresco após concentração das células por centrifugação a 2.500 xg por 20 min. Em seguida, uma alíquota de 1 mL foi depositada em câmara de Sedgwick-Rafter e analisada seguindo metodologia padrão de acordo com Mcalice, (1971). Para identificação dos táxons foram usadas as chaves e as instruções de Bicudo; Menezes (2006); Mcalice, (1971) e para quantificação Müller et al. (2012).

Tanto para a contagem como para a identificação dos táxons foi utilizado um microscópio óptico comum, com retículo de Whipple de 1000 µm em uma das objetivas. Para identificar, medir e contar os táxons utilizou-se um aumento de 100 x. Os organismos foram identificados em nível de gênero (*Cyanobacteria, Chlorophyta, Bacillarophyta*) e o resultado expresso em UPA/mL (Unidade padrão de área = 400 μm^2), organismos/mL e para cianobactérias células/mL.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios para padronização da metodologia

4.1.1 Avaliação dos métodos de Extração/purificação de ácidos nucleicos

4.1.1.1 Trizol-clorofórmio

O trizol possibilitou a extração de DNA e também de RNA e a eficiência do método foi avaliada com base nas concentrações de DNA e RNA obtidas, bem como na pureza.

As concentrações e a pureza dos DNAs obtidos das amostras de esgoto da ETE ABC após extração com Trizol estão apresentadas na tabela 2.

Tabela 2 - Quantificação da concentração e pureza de DNA presente nas amostras de esgoto do ABC extraído com Trizol – clorofórmio, utilizando NanoDrop c2000.

***Pools* de amostras**	**Concentração de DNA (ng/µL)**	**260/280**	**260/230**
1	11,4	1,56	0,36
2	3,7	2,36	0,36
3	3,6	2,4	0,36
4	8,9	1,69	0,38
5	11,4	1,58	0.40
6	5,5	1,82	0,52
7	3,9	1,84	0,46
8	2,5	2,49	2,49

Nesta tabela 2 é observado que nas amostras 1,4,5 a razão 260/280 está abaixo do esperado (razão 1,8 - 2,0) indicando contaminação por proteína ou fenol. As amostras 2 e 8 possuem valores maiores que 2 indicando contaminação por RNA na amostra.

A razão 260/230 apresentou valores abaixo de 1 com exceção da amostra 8, este resultado confirmam os resultados da razão 260/280.

No tabela 3 são apresentados os resultados obtidos após extração de RNA de diversas amostras pelo Trizol-clorofórmio.

Tabela 3 - Quantificação e pureza do RNA e do respectivo cDNA obtidos das amostras de água superficiais e de esgoto, utilizando o NanoDrop c 2000.

Local	***Pool***	**Concentração de RNA (ng/µL)**	**260/280**	**Concentração de cDNA (ng/µL)**	**260/280**
Esgoto do ABC	1	61,26	1,59	390,8	1,94
	2	35,59	1,51	448,7	1,97
	3	30,49	1,43	393,6	1,91
	4	31,16	1,42	465,2	1,96
	5	25,73	1,40	445,7	1,90
	6	29,23	1,46	415,1	1,93
	7	27,1	1,50	384,9	1,94
	8	27,3	1,44	430,4	1,96
Esgoto de Barueri		19,81	1,60	477,4	1,94

De acordo com a tabela 3 as nove amostras processadas de RNA possuem contaminantes proteicos e ou fenólico, já que a razão 260/280 apresentou valores menores que 1,8 nm e não apresentaram resultados acima de 2 na razão 260/280 indicando que provavelmente não houve contaminação de DNA nas amostras e em relação a concentração de cDNA os valores da razão 260/280 atenderam ao esperado.

4.1.1.2 Extração seletva pelo método de Hirt

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos com o método de extração seletiva de Hirt (1967).

Tabela 4- Concentração e pureza de DNA das amostras de água superficiais e de esgoto extraídas por método de Hirt, utilizando NanoDrop c2000 e Qubit 2.0 segue o titulo da anterior.

Amostra	***Pool***	**Quantificação do DNA pelo NanoDrop**			**Quantificação do DNA pelo Qubit 2.0 (ng/µL)**
		Concentração de DNA (ng/µL)	**260/280**	**260/230**	
Esgoto do ABC	1	91,9	1,50	1,65	< 0.005
	2	92,7	1,51	2,11	< 0.005
	3	98,1	1,52	2,32	< 0.005
	4	86,9	1,50	1,98	< 0.005
	5	109,8	1,53	1,91	< 0.005
	6	96,3	1,51	2,18	< 0.005
	7	93,8	1,50	1,09	0.4765
	8	96,9	1,48	1,82	0,476
*** Esgoto de Barueri**		530,8	1,31	0,58	-*
Esgoto de Barueri		96,9	1,31	1,48	0,0255

*amostra descartada

Na tabela 4 as amostras de DNA oriunda do esgoto da ETE ABC apresentaram razão 260/280 e 260/230 abaixo do índice de pureza esperado atestando que essas amostras possuem contaminantes que provavelmente pode ser uma proteína ou uma substância orgânica. No entanto, os *pools* 2, 4, 5 e 8 possuem valores aceitáveis que mostram que eles estão mais livres que os outros *pools* de contaminantes orgânicos

4.1.2 Metagenômica preliminar (Miseq)

Dentre todas as amostras de DNA extraídas por diferentes processos e quantificadas pelo Nanodrop e pelo Qubit a realização da metagenômica somente foi possível a partir da amostra de esgoto de Barueri coletada em 2014, porque este apresentou uma concentração de 1ng/µL e os fragmentos, na etapa da fragmentação, ficaram entre 100 e 500 pb como exigido para o uso do *Kit* recomendado para o sequenciamento nos aparelhos Miseq.

A amostra do esgoto de Barueri originou 168 *contigs*. Dentre estes, apenas 21 *contigs* (12,5 %) foram semelhantes a sequencias virais, sendo 19 (11,3 %) semelhantes a bacteriófagos e 2 (1,2 %) semelhantes a Adenovírus. Os demais *contigs* são semelhantes a procariotos e eucariotos, sendo 129 (76,8 %) semelhantes a bactérias, 1 (0,6 %) semelhante a Archaea e 17 (10,1 %) semelhantes a outros organismos como protozoários e DNA de plantas, mostrando que as amostras analisadas ainda continham muitas sequencias de DNA contaminantes, de origem não viral. Estes resultados revelaram também que os tratamentos preliminares com DNAse, filtração, tratamento com clorofórmio não foram sufientes para eliminar DNAs contaminantes não virais.

4.1.3 Resultados da implementação do processo de purificação das amostras

Após o sequenciamento inicial por Miseq (item 4.1.2) foi observado que as amostras ainda não estavam purificadas o suficiente para se realizar nova análise metagenômica, então foram realizados testes com *DNeasy Blood and Tissue kit* e *Power Soil DNA isolation kit*s para extração dos DNAs, seguidos pela amplificação com o *kit illustra™ Single Cell GenomiPhi™ DNA Amplification.*

As concentrações e a respectiva pureza das amostras de DNA obtidas a partir das amostras de água de esgoto da EE do Pq. Edu Chaves extraída com o kit PowerSoil DNA isolation são apresentadas nas tabelas 5 e 6.

Tabela 5- Quantificação do DNA extraído pelo kit PowerSoil DNA isolation kit obtidos das amostras de esgoto, utilizando o NanoDrop c2000 e Qubit.,antes e após amplificação com *illustra™ Single Cell GenomiPhi™ DNA Amplification*

Amostras	**Antes da amplificação**		**Após amplificação**	
	Concentração de DNA (ng/µL)	**260/280**	**Concentração de DNA (ng/µL)**	**260/280**
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves semeada experimentalmente com adenovírus	< 0.005	1,33	37,6	1,68
Adenovírus diluído em PBS	< 0.005	1,26	0.43	1,65
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves não semeada	< 0.005	1,31	0,50	1,71
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves diluído em PBS	0,0248	1,29	0,60	1,72

Tabela 6- Quantificação do DNA extraído pelo kit da DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), obtidos das amostras de esgoto, utilizando o NanoDrop c2000 e Qubit, antes e após amplificação com *illustra™ Single Cell GenomiPhi™ DNA Amplification*

.

Amostras	**Antes da amplificação**		**Após amplificação**	
	Concentração de DNA (ng/µL)	**260/280**	**Concentração de DNA (ng/µL)**	**260/230**
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves semeada experimentalmente com adenovírus	< 0.005	1,74	53,2	1,86
Adenovírus diluído em PBS	< 0.005	1,74	0,148	1,84
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves não semeada	< 0.005	1,76	39,4	1,98
Amostra de esgoto EE Pq Edu Chaves diluído em PBS	0,372	1,73	36,8	1,83

Os resultados obtidos com os dois kits mostraram que após a extração a concentração de DNA obtida a partir das várias amostras ainda era muito baixa (menor que 0,005 ng/ µL), embora o nível de pureza obtido com o kit *DNEasy Blood and Tissue* foi um pouco maior (tabelas 5 e 6)

A amplificação dos DNAs purificados com os dois kits utilizando o *illustra*^{TM} *Single Cell GenomiPhi*^{TM} *DNA Amplification* kit também foi mais eficiente para o DNA obtido com o *kit DNEasy Blood and Tissue* e com o nível de pureza chegando a 1,98 (tabelas 5 e 6).

Portanto, o kit *DNEasy Blood and Tissue, seguido pelo uso do kit illustra*^{TM} *Single Cell GenomiPhi*^{TM} *DNA Amplification* foram utilizados na preparação das amostras para análise metagenomica Hiseq.

4.2 Avaliação da diversidade viral em amostras de água de manancial e esgoto

4.2.1 Qualidade de *reads* e *contigs*

De acordo com o programa fastQC as *reads* sequenciadas possuíam um tamanho entre 20 até 100 bases, uma boa qualidade, já que elas tiveram bases com valores maior ou igual ao *core* de qualidade *Phred* 33. Após a retirada dos adaptadores *da nextera transposase* através do programa cutdapt as *reads* passaram a possuir no máximo 97 pb.

Nas amostras do manancial de São Lourenço da Serra (SL_Manancial), esgoto de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto), reservatório Guarapiranga (Gua_Manancial) e esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto) foram obtidas *reads* que, após a montagem, geraram *contigs* com tamanhos de, no mínimo, 200 pb e de, no máximo 48.555 pb (tabela 7).

Tabela 7- Número de *reads* e de *contigs* gerados, a partir das amostras de água de manancial e de esgoto, pelo sequenciamento com tecnologia Hiseq.

Amostras	**Quantidade de *Reads***	**Número de *contigs***	**Tamanho dos *contigs***	
			Mínimo	**Máximo**
SL_Esgoto	58.032.806	31.180	200	48.515
TS_Esgoto	59.798.886	141.301	200	48.500
Gua_Manancial	68.265.500	204.743	200	48.555
SL_Manancial	62.767.428	432.903	200	48.500

4.2.2 Analise dos *Contigs*

A análise dos contigs usando o programa Megan 6, mostrou que das 58.032.806 *reads* oriundas do sequenciamento da amostra SL_Esgoto (tabela 7) foram montados pelo programa CLC 31.180 *contigs* e dentre estes 10.536 *contigs* estão

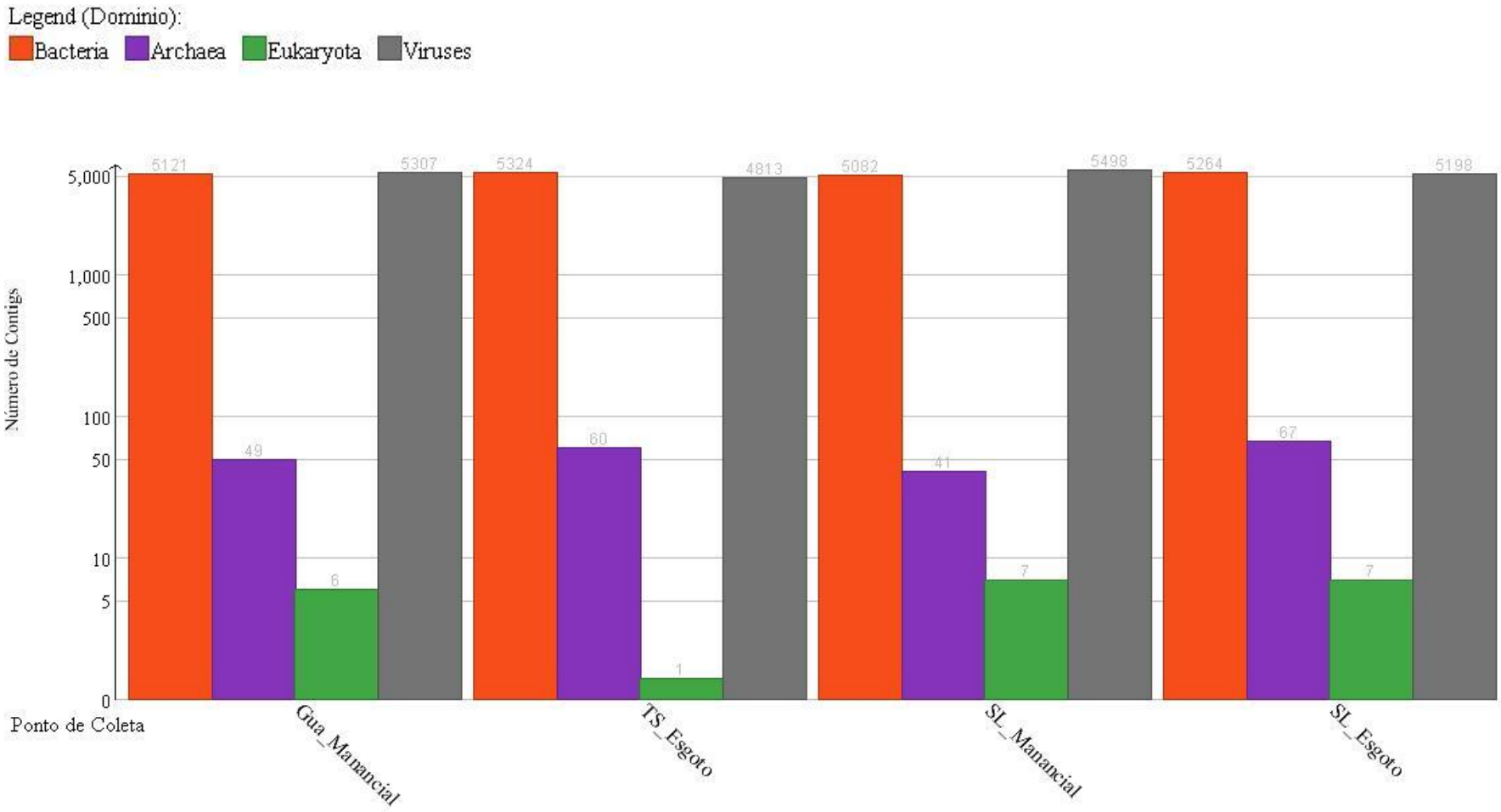
representados na figura 16. No entanto, 20.644 *contigs* não estão representados na figura 16, já que não foram alinhados a nenhum grupo conhecido.

Do mesmo modo, 59.798.886 *reads* oriundas do sequenciamento da amostra TS_Esgoto foram montados 141.301*contigs* dos quais apenas 10.198 *contigs* estão representados na figura 16. Os demais 131.103 não alinharam a nenhum grupo conhecido.

Como também na amostra Gua_Manancial das 68.265.500 *reads* foram montados 204.743, dos quais 10.483 *contigs* estão representados na figura 16. Os 194.260 *contigs* restantes não estão representados por não se alinharam a nenhuma sequência conhecida.

Finalmente, na amostra SL_Manancial foram sequenciados 62.767.428 *reads*, destes 432.903 *contigs* foram montados e destes 10.628 *contigs* foram alinhados aos três dominios da vida e aos vírus. Os restantes 422.275 *contigs* não alinharam a nenhuma sequência conhecida.

Figura 16- Presença de representantes dos domínios Bacteria, Archaea, Eukaryota e vírus nas amostras de água do Manancial de São Lourenço da Serra (SL_Manancial), Esgoto de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto), Reservatório Guarapiranga (Gua_Manancial) e Esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto).



De acordo com a figura 16 a quantidade de *contigs* detectados semelhantes ao domínio Bacterias foi muito próximo da quantidade de *contigs* semelhantes a vírus presentes nos quatro pontos de amostras. Ao analisar o resultado do sequenciamento das amostras de SL_Manancial, Gua_Manancial, SL_Esgotos e TS_Esgoto, o maior número de *contigs* montados tiveram maior similaridade com sequências de vírus (20.816 *contigs*), seguido pelas sequências similares a representantes do domínio Bacteria (20.791 *contigs*), domínio Archaea (197 *contigs*) e por último similares ao domínio Eukaryota (21 *contigs*).

4.2.2.1 Vírus detectados pelo sequenciamento Hiseq

Dentre os 20.816 *contigs* similares a vírus encontrados nas amostras de água de manancial e de esgoto, o maior número estava relacionado a vírus capazes de infectar os micro-organismos do domínio Eukaryota, totalizando 5 famílias de vírus dsDNA, sendo o maior número observado no SL_Manancial 15, 8 % (3281 *contigs*). Por outro lado, o menor número foi observado no TS_Esgoto 13 % (2737 *contigs*).

A família de vírus dsDNA mais representada deste domínio foi a *Phycodnaviridae* (vírus de algas) com maior número de *contigs*, especialmente na água de manancial (603 *contigs*). A segunda família mais numerosa em *contigs* foi a *Mimiviridae* (vírus gigantes de protozoário) com 430 *contigs* na água de manancial. Outras famílias encontradas foram *Marseilleviridae, Herpesvirus, Iridovirus.* A única família representante de ssDNA detectada foi a *Circoviridae* com 141 *contigs* em água de esgoto frente a 24 *contigs* em águas de manancial (figura 17 e tabela 8).

Dentre os *contigs* semelhantes as espécies da família *Phycodnaviridae*, observados na figura 18, foram detectadas as espécies *Phaeocystis globosa* (124 *contigs*) presente principalmente nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial) e São Lourenço da Serra (SL_Manancial), e semelhantemente as outras espécies como *Bathycoccus* sp. (38 *contigs*), *Aureococcus anophagefferens* (34 *contigs*), *Acanthocystis turfacea Chlorella virus* (29 *contigs*), *Paramecium bursaria Chlorella virus AR158* (26 *contigs*), *Micromonas* sp (24 *contigs*), *Emiliania huxleyi virus 86* (22 *contigs*) e *Ectocarpus siliculosus virus I* (15 *contigs*).

Tabela 8- Famílias de vírus de Eukaryota, Bacteria e Archaea classificados por Blastx provenientes da análise metagenômica Hiseq do manancial de São Lourenço da Serra(SL_Manancial), Esgoto de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto), Represa Guarapiranga (Gua_Manancial) e Esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto).

Família	**Acido Nucleico**	**Nº de *contigs***				**Total**		
		SL_ Manancial	**SL_ Esgoto**	**Gua_ Manancial**	**TS_ Esgoto**	**Manancial**	**Esgoto**	**Total geral**
Família de Vírus de Eukaryota								
Circoviridae	ssDNA(+) circular	14	133	10	8	24	141	165
Herpesviridae	dsDNA linear	11	2	24	0	35	2	37
Iridoviridae	dsDNA linear	29	0	19	4	48	4	52
Marseilleviridae	dsDNA circular	13	2	8	4	21	6	27
Mimiviridae	dsDNA linear	264	14	166	10	430	24	454
Phycodnaviridae	dsDNA linear	356	12	247	17	603	29	632
	Total	**674**	**30**	**474**	**43**	1148	73	1221
Família de Vírus de Bacteria e Archaea								
Inoviridae	ssDNA circular	10	2	3	28	13	30	43
Microviridae	ssDNA(+) circular	28	56	2	50	30	106	136
Myoviridae	dsDNA linear	1480	986	925	741	2405	1727	4132
Podoviridae	dsDNA linear	400	554	654	655	1054	1209	2263
Siphoviridae	dsDNA linear	689	1313	820	1220	1509	2533	4042
Bicaudaviridae	dsDNA circular	6	0	0	3	6	3	9
Lipothrixviridae	dsDNA linear	7	1	0	2	7	3	10
	Total	**2.620**	**2.912**	**2.404**	**2.699**	5024	5611	10635
Vírus não classificado								
Caudovirales		48	26	98	38	146	64	210
Fagos de dsDNA		10	65	194	77	204	142	346
Vírus sem ser fagos dsDNA		121	14	56	13	177	27	204
Vírus sem ser fagos ssDNA		26	105	30	45	56	150	206
Fagos		48	2	24	22	72	24	96
Total		**253**	**212**	**402**	**195**	655	407	1062

Fonte: ICTV 2016 e viralzone, 2016.

Figura 17- Relação das famílias de vírus capazes de infectar Eukaryota presentes nas águas dos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).

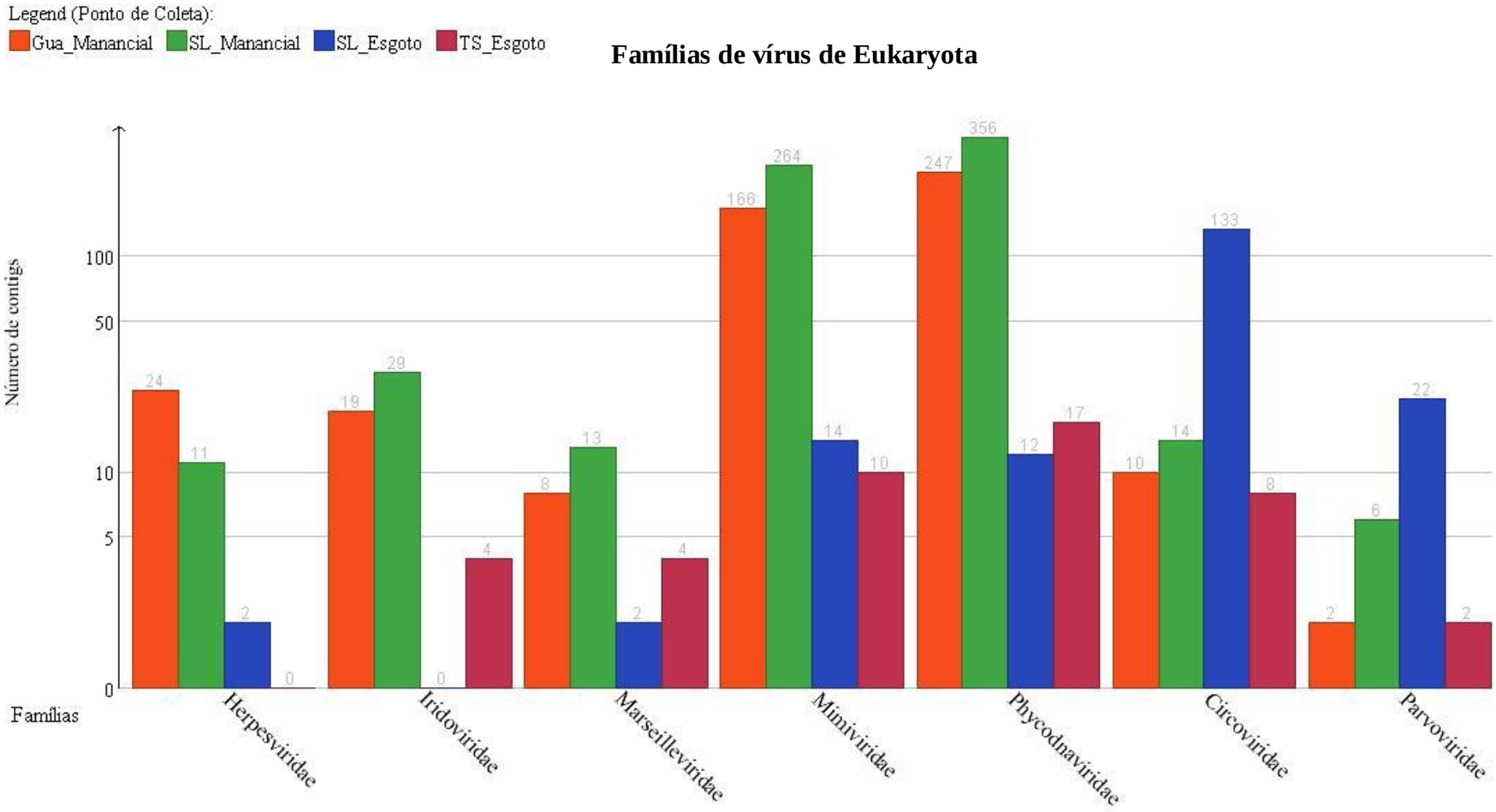
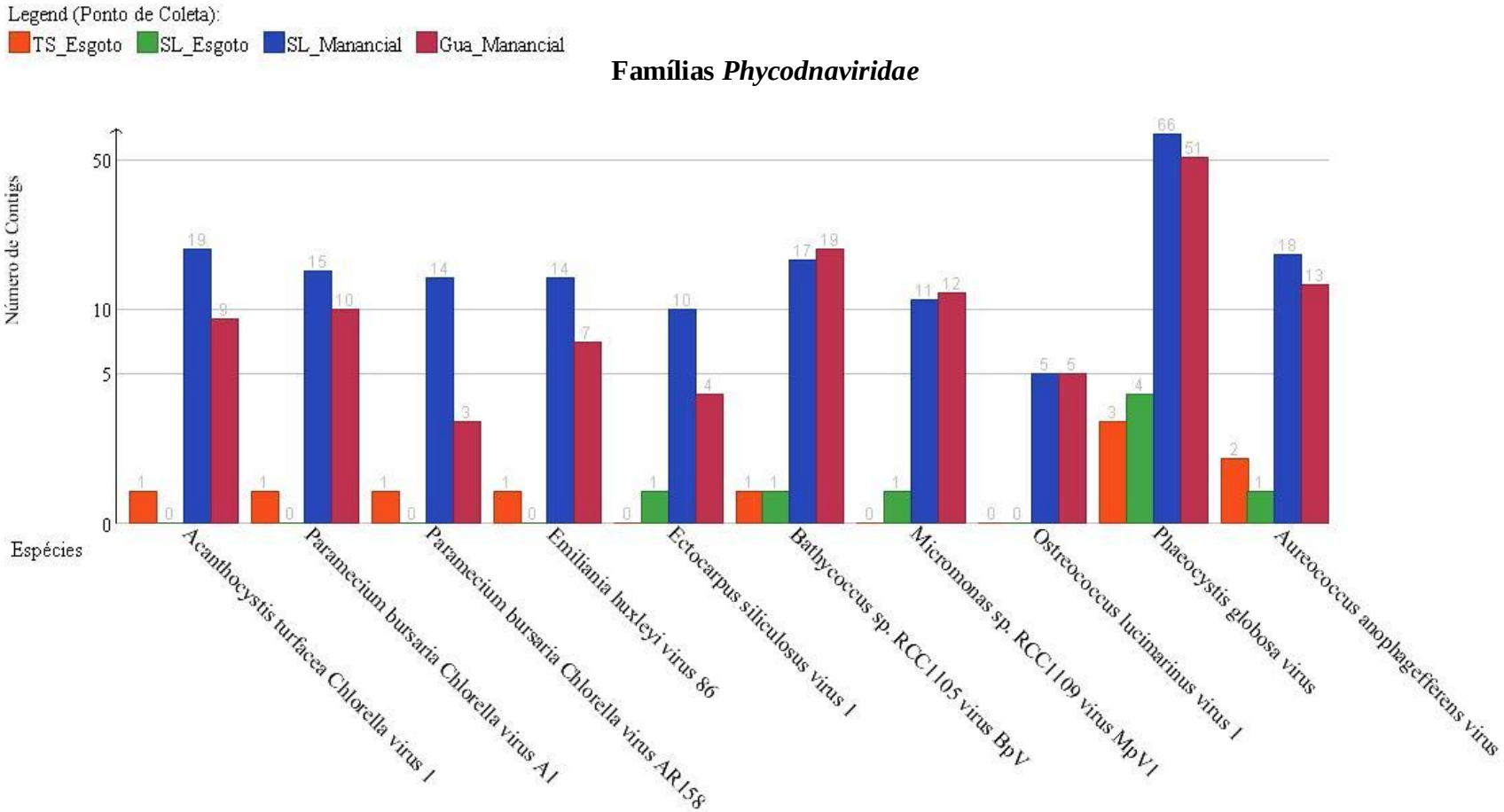


Figura 18- Relação das espécies de vírus de algas da família *Phycodnaviridae* presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).



A segunda família de vírus mais bem representada foi a *Mimiviridae,vírus gigantes de* protozoários, *com um total de 454 contings sendo encontrados* 264 *contigs* no SL_Manancial, 166 *contigs* Gua_Manancial, 14 no SL_Esgoto e 10 *contig* TS_Esgoto (figura 17).

A espécie *Cafeteria roenbergens* (84 *contigs*) foi encontrada nos quatro pontos de coletas, no entanto, a maior concentração dos *contigs* foi detectada nos mananciais. Esta espécie foi seguida pela espécie *Acanthamoeba polyphaga mimivirius* (12 *contigs*) presente somente nos mananciais, *Megavirus chiliensis* (15 *contigs*), Mimivirus *terra 1*, *Mimivirus terra 2* e Moumouvirus (25 *contigs*) presentes em três pontos de coleta como observado na figura 19.

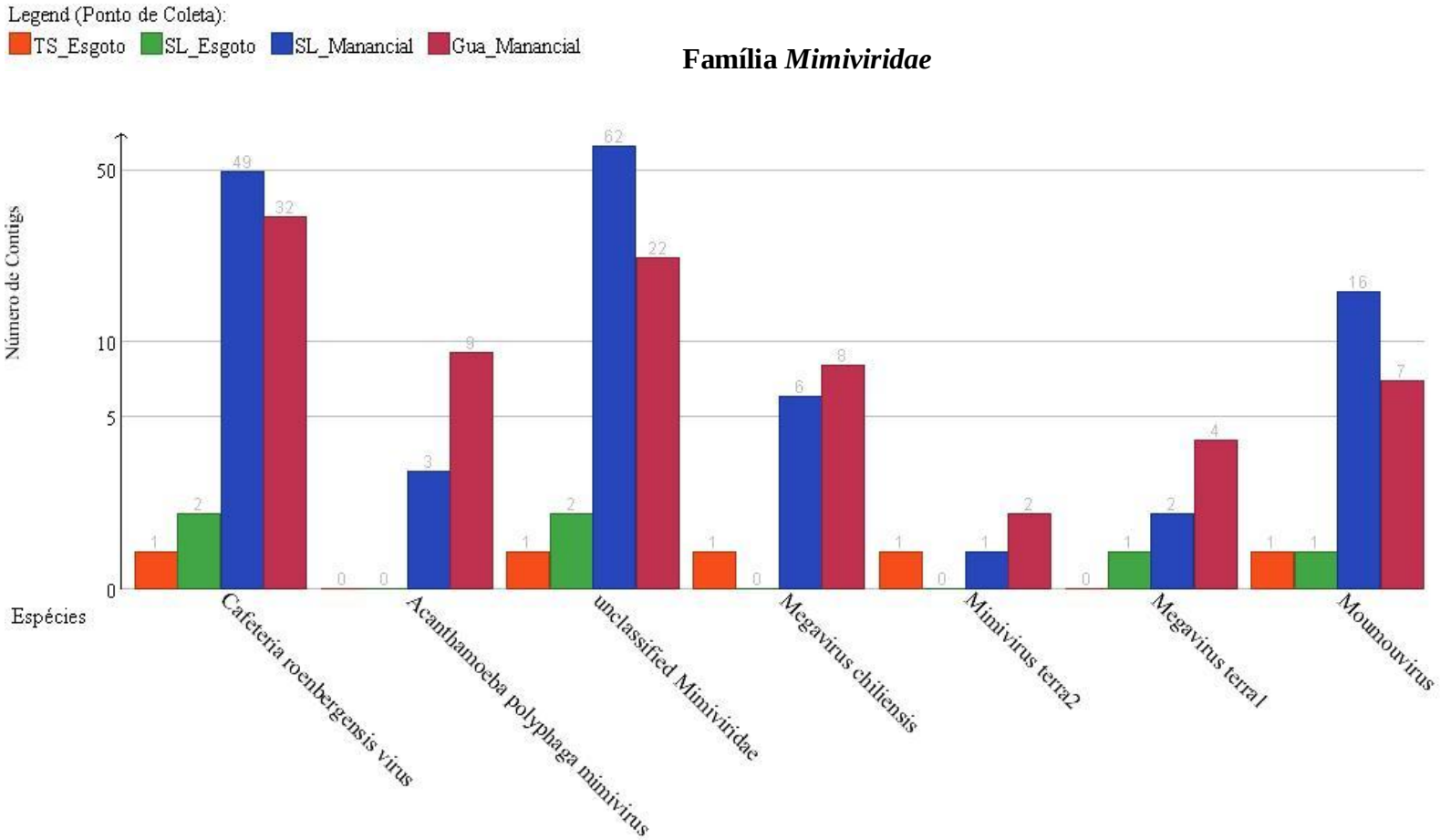
A terceira família de vírus mais representativa foi a família *Circoviridae* que é constituída por vírus de ssDNA comuns em ambientes contaminados por fezes, estando presente no SL_Esgoto (133 *contigs*), SL_Manancial (14 *contigs*), Gua_Manancial (10 *contigs*) e TS_Esgoto (8 *contigs*) como observado na tabela 8 e figura 17. Também foram detectadas as espécies *Avon_heathcote Estuary associated circular* virus e a espécie *Po-Circo-like virus 4* nos quatro pontos de coleta (não representadas nas figuras).

Foram detectadas também espécies virais da família *Herpesviridae* (figura 17) presentes no Reservatório Guarapiranga (Gua_Manancial), na ETA de São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e na ETE de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto). Na represa de Guarapiranga foram detectadas sequencias de herpesvírus humanos dos tipos 4 (*Human herpesvirus* 4), 6A (*Human herpesvirus* 6A) e 8 (*Human herpesvirus* 8), mas também predominantemente espécies oriundas de animais como *peixes (Cyprinid herpesvirus* 1, *Cyprinid herpesvirus* 3*), equinos (Equid herpesvirus* 3, *Equid herpesvirus* 4, *Equid herpesvirus* 8, *Equid herpesvirus* 9*), bovinos (Bovine herpesvirus* 1*), macacos (Cercopithecine herpesvirrus* 5, *Macacine herpesvirus* 1 ou herpesvirus símio B, *Ateline herpesvirus* 3, *Papiine herpesvirus* 2, *Panine herpesvirus2)* e roedor *(Tupaiid herpesvirus 1*).

No ponto de coleta SL_Manancial foram detectadas as espécies *Ateline herpesvirus* 3, *Human herpesvirus* 6A, *Papiine herpesvirus* 2, *Equid herpesvirus* 4, *Equid herpesvirus* 8, *Abalone herpesvirus victoria*. No ponto de coleta SL_Esgoto foram detectas duas espécies *Cercopithecine herpesvirus* 2 e *Human herpesvirus* 1. Devido ao baixo número de *contigs* (só 1) estas espécies da família *Herpesviridade* não foram representadas graficamente.

Em relação aos vírus capazes de infectar os domínios Bacteria e Archaea foram identificadas 7 famílias e sendo 5 famílias de dsDNA e 2 ssDNA. Estes *contigs* foram listados e classificados por genoma na tabela 8. Na figura 20 são apresentadas as famílias com número de *contigs* mais relevantes.

Figura 19- Relação das espécies de vírus da família *Mimiviridae* que infectam amebas presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).



Os fagos, especialmente os classificados na ordem Caudovirales estão presentes em todos os quatro pontos de coleta, tanto no esgoto como no como pode ser observado na figura 20. No esgoto as famílias que possuem mais *contigs* montados foram a família *Syphoviridae*, família *Myoviridae* e por último a família *Podoviridae* (tabela 8)

Dentre os 2.912 *contigs* presentes na amostra de SL_Esgoto os *contigs* mais presentes foram os semelhantes a família *Siphoviridae* (1313 *contigs*), como observado na tabela 8 e figura 24. Dentre os 2.699 *contigs* na amostra TS_Esgoto os mais representativos foram aqueles semelhantes a família *Siphoviridae* (1220 *contigs*), dentre os 2.620 *contigs* da amostra de SL_Manancial os *contigs* mais representativos foram os semelhantes a família *Myoviridae* (1480 *contigs*) e dentre os 2.404 *contigs* da amostra de Gua_Manancial os *contigs* mais representativos foram os semelhantes a família *Myoviridae* (925 *contigs*).

A família *Podoviridae* foi detectada em todos pontos de coleta, e ela foi mais presente na amostra TS_Esgoto, no entanto, em menor quantidade que as outras duas famílias dessa ordem.

As espécies de cada família são apresentadas nas figuras 21, 22,23 e 24.

Figura 20- Relação das famílias de vírus capazes de infectar Bacteria presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).

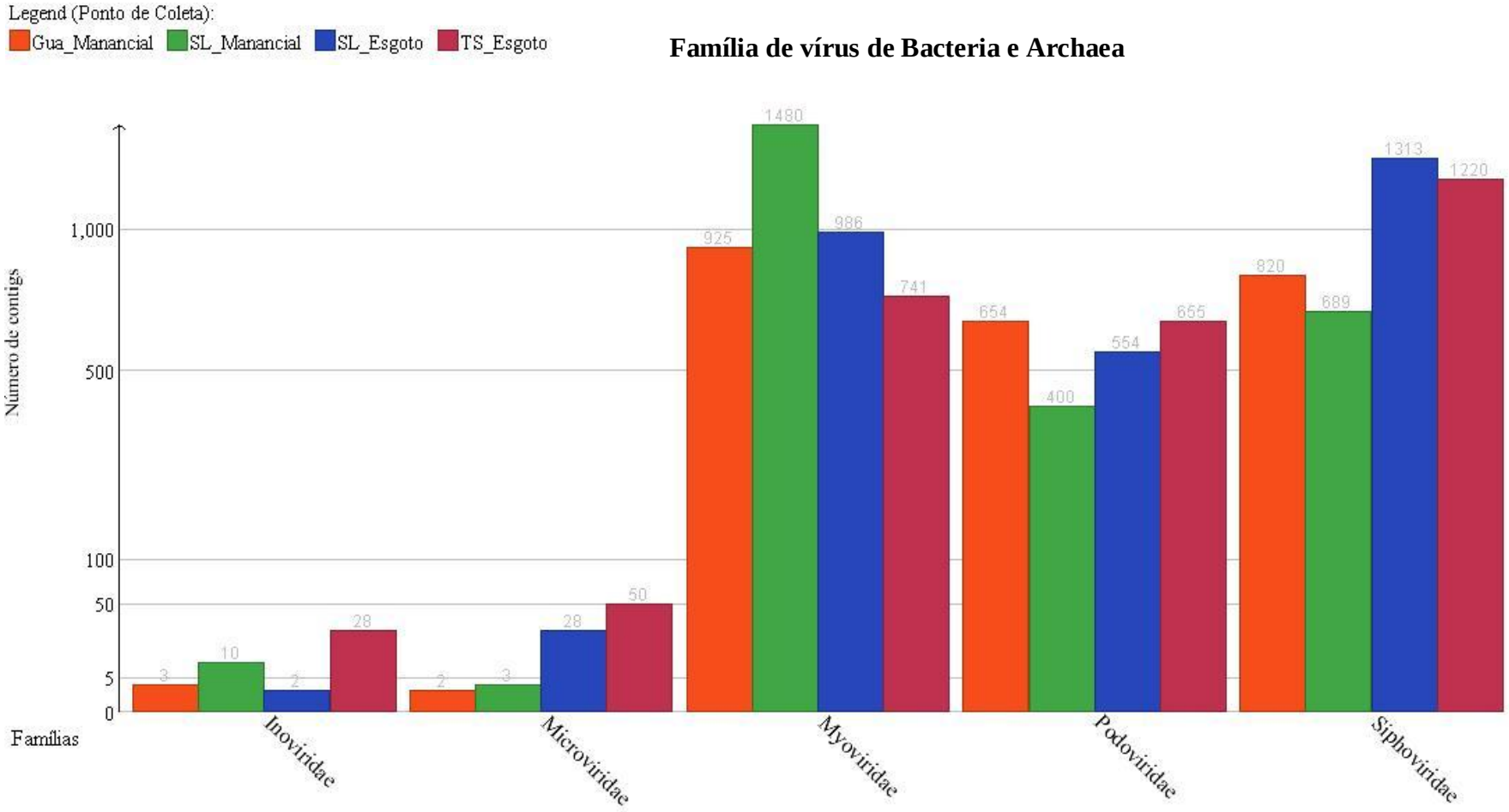
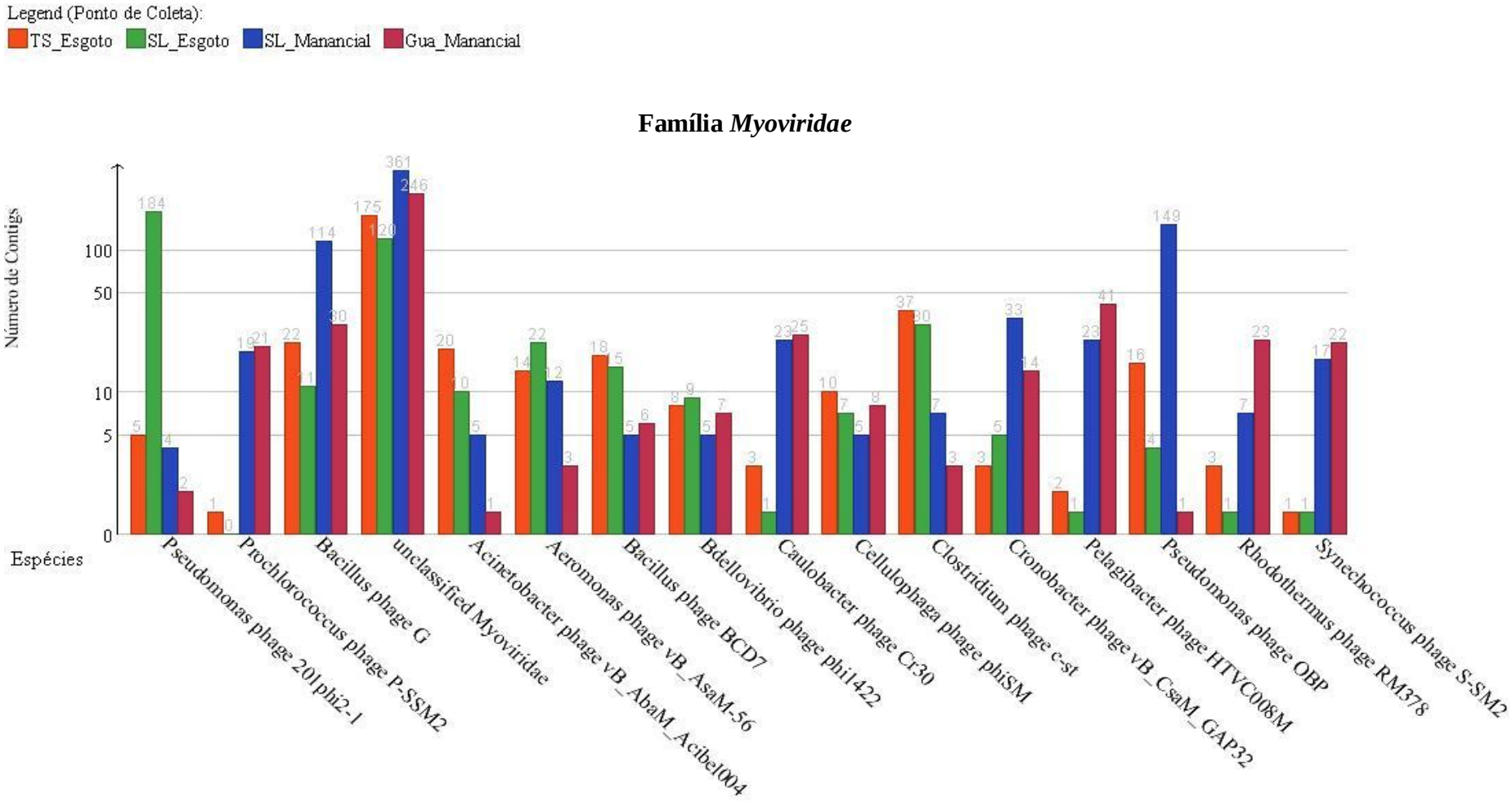


Figura 21- Relação das espécies de bacteriófagos da família *Myoviridae* presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).

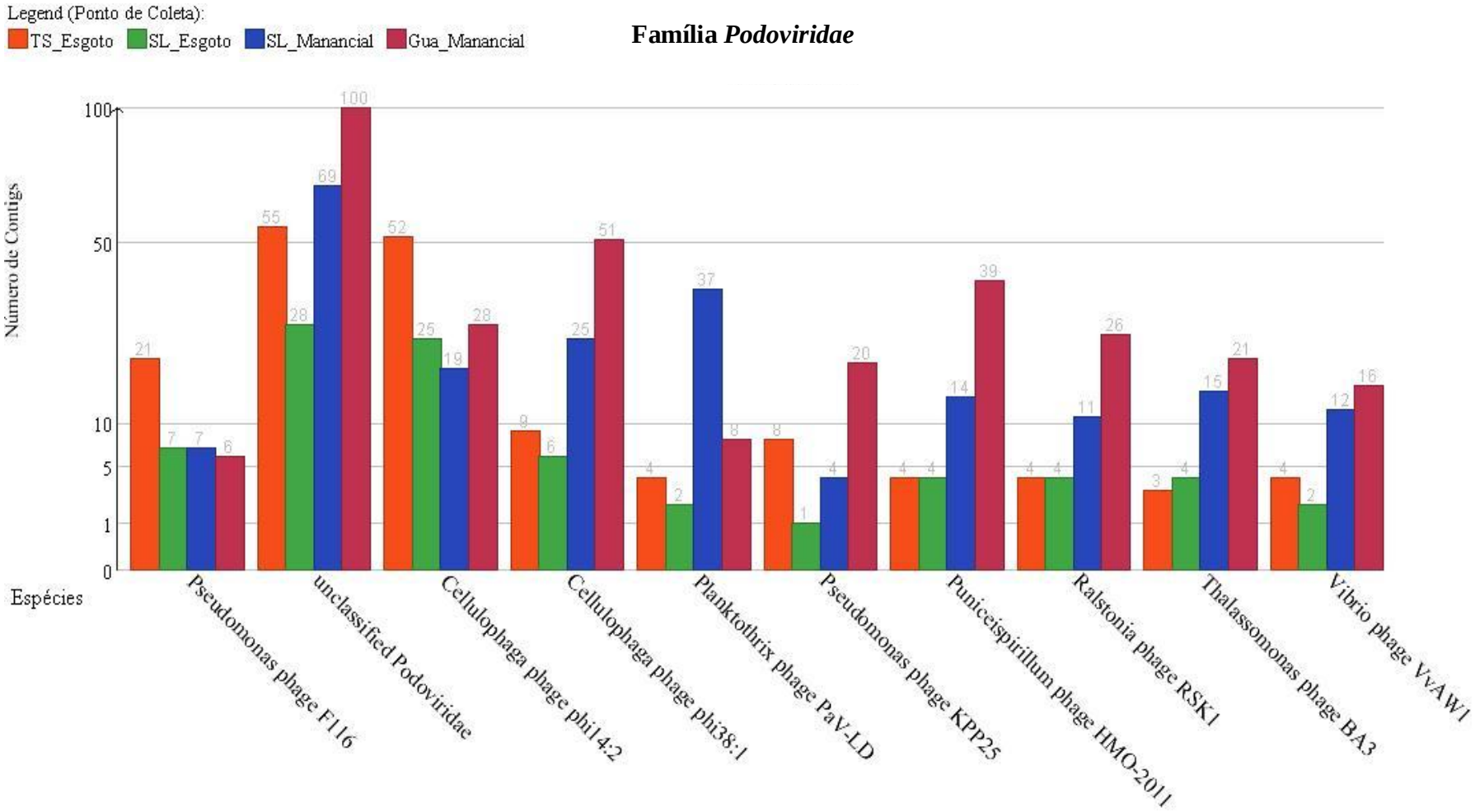


Dentro da família *Myoviridae,* a espécie mais representativa no esgoto foi a espécie *Pseudomonas phage 201 phi 2-1* (184 *contigs*), na amostra SL_Esgoto e na amostra SL_Manancial. a espécie que foi detectada em maior quantidade foi a espécie *Pseudomonas phage OBP* (149 *contigs*), no entanto, a maior quantidade de *contigs* montados foi de *Myoviridae* não classificados, esse grupo foi detectado nos quatro pontos de coleta, em acordo com a figura 21.

Dentre os membros da família *Myoviridae* destacam-se os vírus capazes de infectar as bactérias autóctones, como os fagos de cianobactérias *Prochlorococcus* e de *Synectococcus*, os fagos que infectam bactérias aeróbias *Cellulophaga, Pelagibacter* e *Rhodothermus*, como também as espécies de vírus *Pseudomonas phage 201 phi 2-1, Pseudomonas phage S-SM2* e *Aeromonas phage* que são capazes de infectar bactérias anaeróbias facultativas presentes em água doce em varias partes do mundo.

Também foram encontrados vírus alóctones na família Myoviridae que incluem fagos específicos para as espécies de bactérias comuns no solo como *Bacillusc, Bdellovibrio* e *Clostridium*.

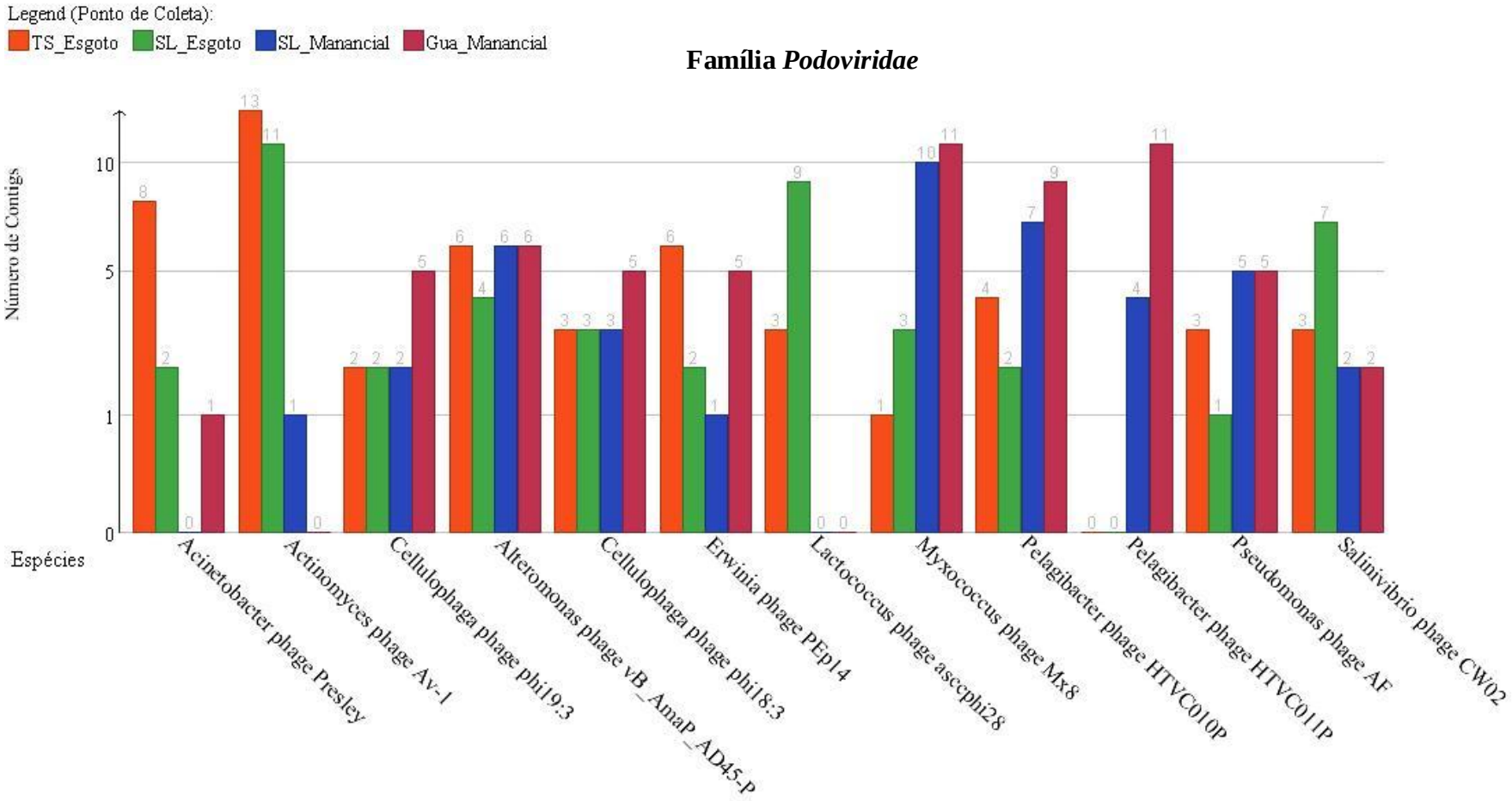
Figura 22- Relação das espécies de bacteriófagos da família *Podoviridae* presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).



De acordo com as figuras 22 e 23 as espécies da família *Podoviridae,* comuns no meio ambiente aquático (autóctones), são espécies de vírus capazes infectar bactérias *Cellulophaga*, *Pseudomonas*, *Puniceispirillum*, *Thalassomonas, Ateromonas, Salinivibrio, Pelagibacter* e *Vibrio.* Foram encontrados também *contigs* de fagos capazes de infectar as cianobactérias como o *Planktothrix phage PaV-LD* e *Cellulophage, além de* fagos que infectam bactérias de solo como *Ralstonia*, *Acinetobacter*, *Erwinia*, *Lactococcus* e *Myxococcus*.

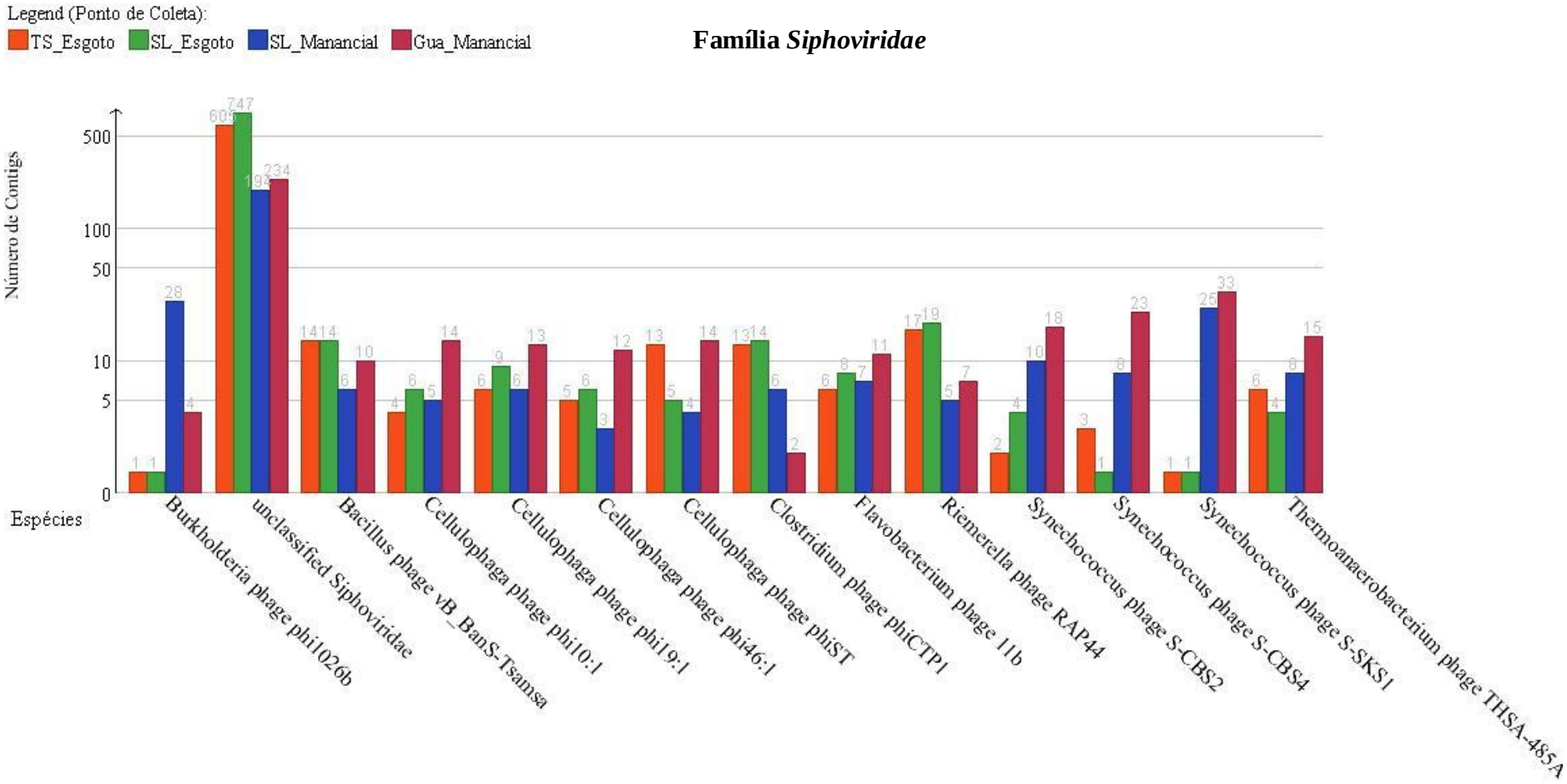
De acordo com a figura 24, as espécies da família *Siphoviridae,* comuns no meio ambiente aquático (autóctones), são capazes infectar bactérias *Cellulophaga, Flavobacterium* e cianobactérias *Synechococcus.* A família conta também com vírus que são alóctone ao ambiente aquático como os fagos *Burkholderia***,** *Bacillus, Clostridium, Riemerella* e *Thermoanaerobacterium*.

Figura 23- Relação das espécies de bacteriófagos da família *Podoviridae* presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).



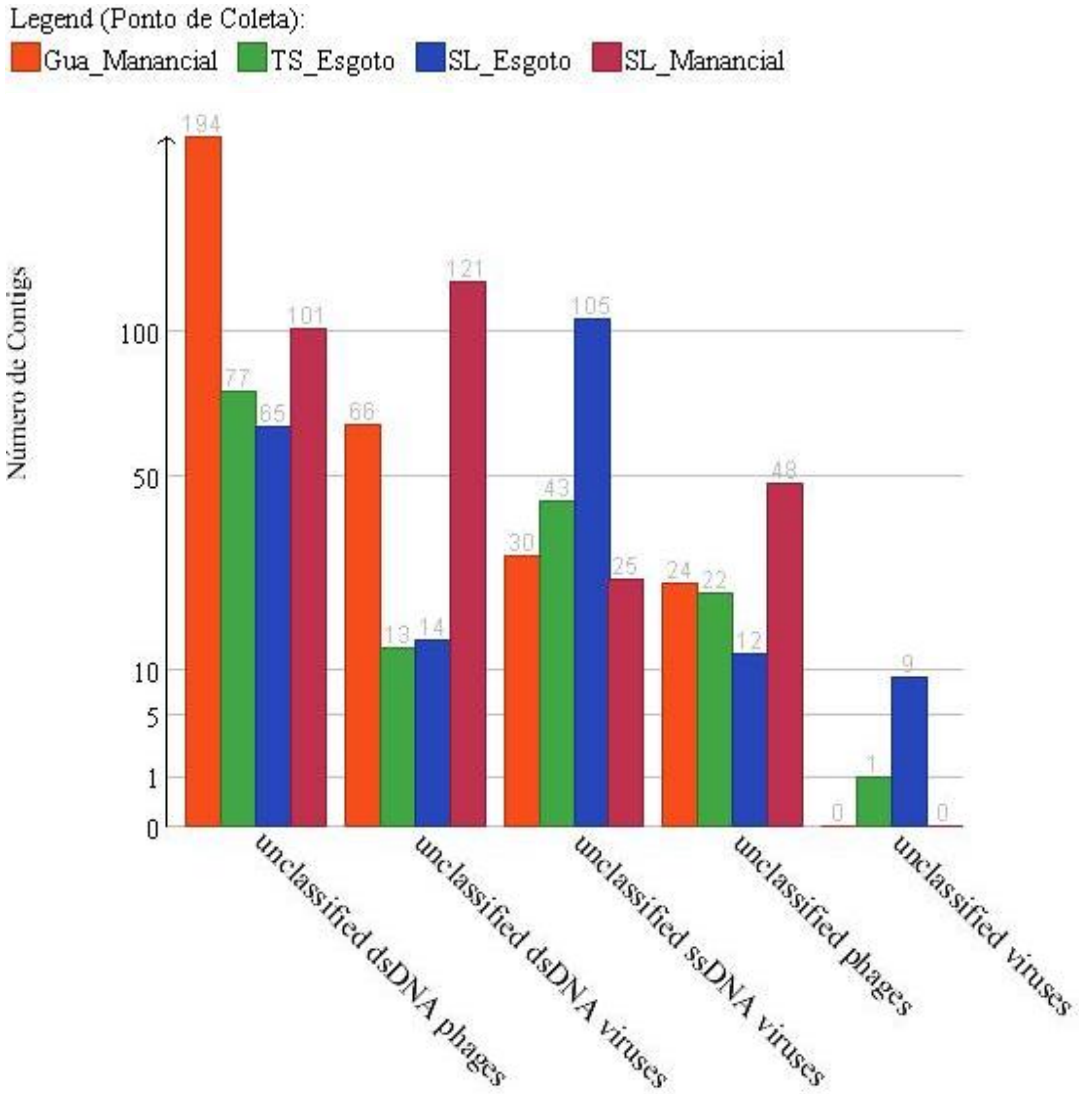
De acordo com a figura 24 as espécies virais da família *Siphoviridae* comuns no meio ambiente aquático (autóctones) são espécies capazes infectar bactérias *Cellulophaga*, *Flavobacterium* e cianobactérias *Synechococcus*. Vírus alóctones do ambiente aquático como os fagos de *Burkholderia***,** *Bacillus*, *Clostridium*, *Riemerella* e *Thermoanaerobacterium* também foram encontrados.

Figura 24- Relação das espécies de bacteriófagos da família *Siphoviridae* presentes nos mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial), São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e nos esgotos de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto) e Taboão da Serra (TS_Esgoto).



Cabe ressaltar que muitos *contigs* de origem viral não puderam ser classificados em nenhuma família conhecida (figuras 17 e 25). Na figura 25, não são apresentados *contigs* referentes aos fagos de genoma de RNA, pois estes não foram alvo do presente estudo.

Figura 25- Imagem comparativa dos vírus de DNA e das vírus não classificados nas amostras do Manancial de São Lourenço da Serra (SL_Manancial), Esgoto de São Lourenço da Serra (SL_Esgoto), Reservatório Guarapiranga (Gua_Manancial) e Esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto).



Conforme a figura 25 a amostra Gua_Manancial foi onde se detectou a maior quantidade de *contigs* 61,8 % (194 *contigs*) de dsDNA de fagos, no entanto, esses fagos não tiveram as suas famílias classificadas. Nesta figura, também foi possível observar que na amostra SL_Manancial 121 *contigs* (41 %) de vírus de dsDNA não foram classificados, sabe-se que esses *contigs* são de vírus, mas não foi possível classificar se são vírus de Archaea, ou vírus de Eukaryota e também, nesta amostra, 48 *contigs* (16 %) que foram classificados como fagos, no entanto, não foi possível saber se são de ssDNA ou dsDNA.

.

Na amostra de SL_Esgoto teve mais *contigs* de ssDNA 51 % (105 *contigs*) de vírus que não tiveram as famílias classificadas e finalmente 9 *contigs* (4 %) são classificados como vírus mas não foi identificados entre os ssDNA e dsDNA.

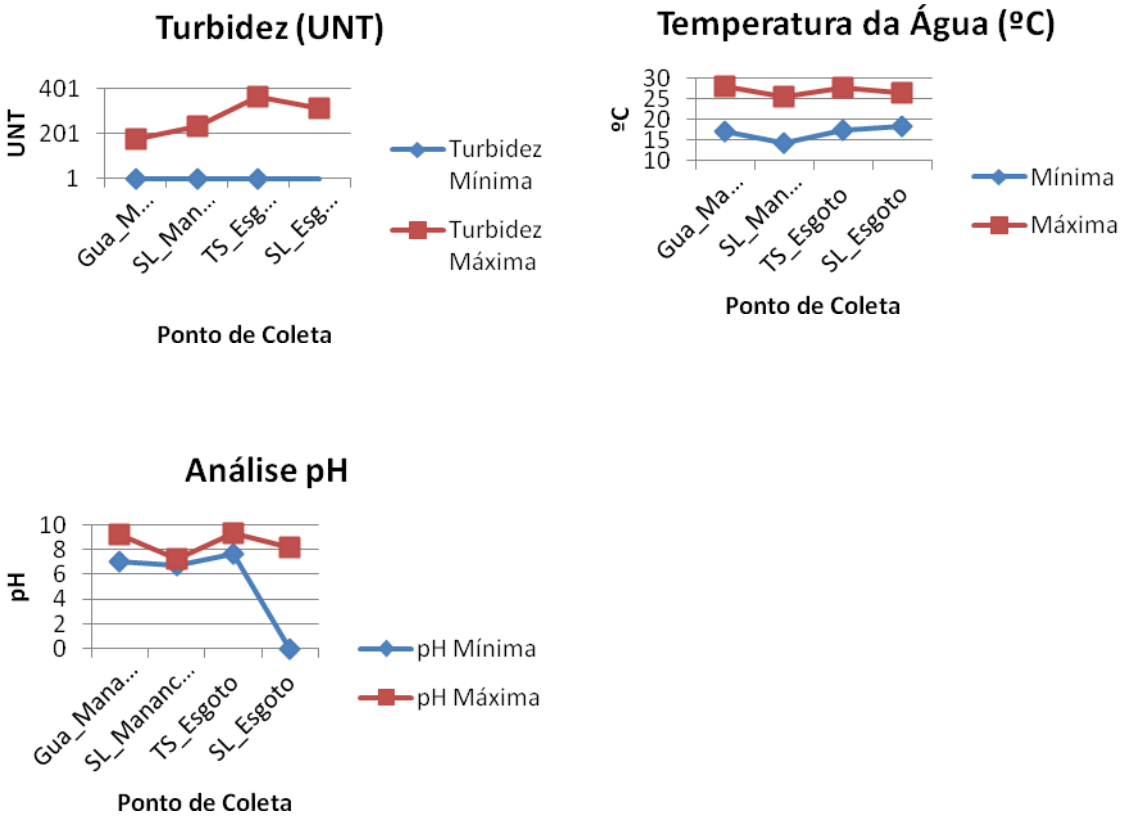
Juntamente com os vírus foram montados alguns *contigs* dos domínios Bacteria e Archaea. Dentre os quais cabe ressaltar as famílias *Candidatus Brocadiaceae* (Domínio Bacteria) com 12 *contigs* no SL_Manancial e 43 *contigs* no Gua_Manancial; a família *Halobacteriaceae* (Domínio Archaea) com 825 *contigs* no SL_Esgoto; família *Halobacteroidaceae* (Domínio Bacteria) com 7.165 *contigs* no SL_Manancial; família *Halomonadaceae* (Domínio Bacteria) presentes no Gua_Manancial (3.338 *contigs*) e TS_Esgoto (4.868 *contigs*) e a família *Methylocystaceae* (Domínio Bacteria) detectada nos SL_Manancial (13 *contigs*) e Gua_Manancial (149 *contigs*).

4.3 Caracterização físico-quimica e microbiológica das amostras de água

Os resultados dos parâmetros físico-químicos obtidos no período de jan a dez de 2013 nos pontos amostrais são apreserntados na figura 26, e tabela 9 e anexo A.

.

Figura 26 - Características físico-químicas (temperatura, turbidez e pH) das amostras de água do manancial Guarapiranga (Gua_Manancial), manancial São Lourenço (SL_Manancial) e águas de esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto) e São Lourenço (SL_Esgoto) no período de jan a dez de 2013.



.

Tabela 9 - Valores máximos e mínimos dos parâmetros físico-químicos (turbidez, pH e temperatura) das amostras de água do mananciais Guarapiranga (Gua_Manancial) e São Lourenço da Serra (SL_Manancial) e águas de esgoto de Taboão da Serra (TS_Esgoto) e São Lourenço (SL_Esgoto) no período de jan a dez de 2013.

Amostras	**Turbidez (UNT)***		**pH****		**Temperatura da água (ºC)**	
	Mínima	**Máxima**	**Mínima**	**Máxima**	**Mínima**	**Máxima**
Gua_manancial	<1,00	176	7,03	9,24	17,10	28,00
Sl_manancial	<1,00	234	6,71	7,22	14,10	25,50
Ts_esgoto	1,45	362	7,67	9,30	17,40	27,80
Sl_esgoto	3.22	311	6.63	8,14	18,20	26,40
Limites conama 357/2005 Classe 2	Até 100		6,0 a 9,0		N.d.***	

Fonte: Projeto Fapesp
*Turbidez: característica que reflete o grau de transparência da água; UNT: Unidades Nefelométricas de Turbidez.
**pH: colog da concentração hidrogeniônica do meio.
*** Resolução do Conama357/2005 não declara nada sobre temperatura.

Pode ser observado que as variações de pH estão dentro da faixa preconizada pela legislação, exceto a turbidez para corpos dágua classe 2. Quanto a temperatura, não houve nenhuma condição atípica.

Os números de *E. coli* variaram de 740 a 3,3x 10^7 UFC por 100 mL com valor médio de 4,8, x 10^6 (DP= 8,44 x10^6) na água de esgoto de Taboão da Serra. No manancial Guarapiranga os números variaram de <1 – 184 UFC/100 mL com valor médio de 17,04 UFC/100 mL (DP=50,60).

Na água de esgoto de SL os números de *E.coli* variaram de 1,0 x 10^3 a 1,5 x 10^7 com valor médio de 2,1 x 10^6 (DP=4,16x10^8). No manancial, por outro lado, os números variaram de 1,3 x 10^3 a 8,6 x 10^3 UFC/100 mL com valor médio de 3,98 x 10^3 UFC/100 mL.

O resultado da análise preliminar de fitoplâncton no reservatório Guarapiranga (Gua_Manancial) coletada em abril de 2013 revelou a presença de diversos grupos de algas (tabela 10) inclusive cianobactérias produtoras de toxinas como os gêneros *Anabaena*, *Cylindrospermopsis*, *Planktothrix* (tabela 11).

.

Tabela 10 - Análise de fitoplâncton do manancial Guarapiranga no mês de abril de 2013.

Organismo	**Número de indivíduos/mL**	**UPA/mL**
Cianobactérias	395,8	598,3
Chlorophyta	2271,8	1545,8
Bacillarophyta	993,9	425,8
Outras Algas*	164,7	215,3
Outros Micro-organismos	1335,3	574,8
TOTAL	**5161,6**	**3360,1**

*Outras algas: fitoflagelados e algas exceto *Chlorophyta* e *Bacillariophyta*.
Número de plâncton por mililitro (mL)
Unidade Padrão de Área (UPA) por mililitro (mL).

Tabela 11 - Contagem dos gêneros das cianobactérias por mililitro (mL) do manancial Guarapiranga.

Gênero de Cianobactérias	**cel/mL**
Anabaena	870,4
Cylindrospermopsis	32,6
Geitlerinema	45,3
Merismopedia	120,8
Microcystis	2598,7
Planktothrix	20,9
Pseudanabaena	1142,4
Total	**4.831,1**

As contagens de fitoplancton não foram realizadas ao longo de 2013 nas amostras utilizadas no presente estudo, mas dados referentes ao mesmo período foram disponibilizados pela SABESP (http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=43) e transcritos no Anexo A. Os números de cianobactérias variaram de 2.488,6 a 16.361,2 células por mL com média de 6.827 células/mL.

.

DISCUSSÃO

O presente estudo foi decorrente de um estudo mais amplo financiado pela Fapesp dentro do Programa de Apoio à Pesquisa em Parceria para Inovação Tecnológica (PITE-FAPESP, Processo No. 2010/50797-4.) que visava avaliar a qualidade microbiológica e virológica de um dos mananciais mais importantes para a região metropolitana de SP, a represa Guarapiranga, bem como ao esgoto que aflui para o local sem tratamento. O estudo abrangeu também um manancial de SL da Serra cujo uso para abastecimento está previsto para 2018 (FOLHA DE SÃO PAULO, 2016).

A contaminação da represa de Guarapiranga é conhecida e constantemente monitorada. Tanto a água do manancial Guarapiranga quanto a água de esgoto de Taboão da Serra foram escolhidos por atender parte da população paulista que era, até então, abastecida pelo sistema Cantareira, passando de 3,9 milhões de pessoas para 4,9 milhões de moradores de São Paulo. Infelizmente o Reservatório Guarapiranga recebe 300 toneladas de esgoto e lixo gerados pelos moradores do entorno como também recebe água extremamente poluída da transposição da Represa Billings, de 4000 litros por segundo, e também esse reservatório, no começo de 2014, passou por uma grande seca de 2014-2015 (COLOMBO, 2015).

O manancial de São Lourenço, por outro lado, tem um índice de contaminação muito baixo, por estar situado em região de preservação ambiental (PREFEITURA DE SÃO LOURENÇO DA SERRA, 2011). A ETE e ETA de São Lourenço da Serra foram escolhidas por estarem situadas a sudoeste da região metropolitana de São Paulo e também por ter a maior parte do seu território sob vegetação nativa de mata Atlântica e por conta disso está sob a proteção Ambiental Estadual da Serra do Mar e está inserida na zona de preservação dos mananciais de acordo com as Leis Estaduais 898/75, 1172/76 e 9866/97 (BRASIL, 1975; BRASIL, 1976; BRASIL, 97). Mesmo estando em área de proteção, o rio de São Lourenço da Serra recebe a carga poluidora de São Lourenço da Serra e Juquitiba. A água que abastece o rio São Lourenço é oriunda da cachoeira do França, onde a Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo (Sabesp), juntamente com parceria privada, formam o grupo empreendedor denominado Parceria Público Privada (PPP) que vai construir um sistema de captação para atender a população de Barueri, Carapicuíba, Cotia, Itapeva, Jandira, Santana do Parnaíba e Vargem Grande Paulista (SINAENCO, 2017).

A caracterização das amostras de origem ambiental, assim como, as águas de manancial e de esgoto, sob o ponto de vista dos parâmetros físico-químicos e

.

microbiológicos, é essencial em qualquer estudo ambiental, bem como a localização exata dos pontos de coleta. No presente estudo, estes parâmetros são muito importantes por se tratarem de águas com níveis de contaminação diferentes. Todos os parâmetros físico-químicos e biológicos apresentaram-se dentro dos índices esperados para cada tipo de água, não havendo nenhuma ocorrência atípica, exceto a turbidez de algumas amostras de esgoto. De acordo com o Conama 357/2005, o índice máximo de turbidez permitido na água é de 100 UNT, no entanto, estas amostras apresentaram um valor bem mais alto ultrapassando 300 UNT (figura 26 e tabela 9). Segundo a Resolução 357 do CONAMA, datada de 2005, que dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, a caracterização das águas de manancial com base nas espécies de fitoplancton também deve ser considerada, especialmente das cianobactérias, em se tratando de manancial para fins de abastecimento (CONAMA, 2005). Quanto à caracterização de fitoplancton, várias espécies de cianobactérias foram identificadas, mas sem representarem risco à qualidade das águas, uma vez que de acordo com a referida Resolução Conama de 2005, a densidade de cianobactérias deve ser, no máximo, 20.000 cel/mL (CONAMA, 2005).

No presente estudo, o objetivo foi verificar a presença de vírus autóctones nessas águas, bem como vírus alóctones, introduzidos nesses ambientes através dos lançamentos de esgoto. Por ser tratarem de amostras ambientais complexas a serem submetidas a métodos moleculares que exigem elevado nível de pureza, na etapa inicial foram avaliados alguns processos para extração e purificação destas amostras.

5.1 Processamento da amostra

A contaminação do meio aquático ocorre pelo despejo de material fecal de diversas origens relacionadas com as atividades humanas, e mesmo as águas consideradas potáveis podem conter vírus. Um dos métodos utilizado para recuperação destes vírus é a filtração em membrana eletropositiva, baseada nas propriedades, que os vírus possuem no ambiente aquático. A primeira característica é a propriedade de coloide hidrofílico de natureza anfotérica, outra característica é a capacidade que eles possuem de interagir com ácido ou uma base, dependendo da variação do pH e da força iônica do meio ambiente. Esta capacidade é uma vantagem no ambiente aquático, onde as partículas virais apresentam polaridades que permitem a sua adsorção em diferentes matrizes carregadas (GARRAFA, 2009).

.

A membrana eletropositiva usada no presente é constituída por celulose e terra de diatomáceas e foi utilizada, inicialmente, para a concentração de poliovírus por Sobsey; Jones (1979) e, posteriormente, para a concentração de rotavírus, adenovírus, vírus da hepatite A inclusive no Brasil (GARRAFA, 2009; MEHNERT; STEWIEN, 1993; QUEIROZ et al., 2001; SASSAROLI, 2002).

O inconveniente do método de filtração é a necessidade de uma etapa de reconcentração. Neste caso, um dos métodos utilizados é a ultracentrifugação, dado o grande volume de solução eluente obtido após a filtração. A ultracentrifugação foi utilizada por Mehnert; Stewien (1993) para concentração de rotavírus de água de esgoto e de córrego, por PINA et al. (1998) em estudo para pesquisa de hepatite E em amostras de esgoto e vários outros como Garrafa (2009); Prado et al. (2014); Queiroz et al. (2001); Sassaroli (2002). Recentemente, o método de filtração utilizando cartuchos, seguido por ultracentrifugação, foi avaliado para caracterização metagenômica de vírus, bactérias e eucariotos em águas de superfície (UYAGUARI-DIAZ et al., 2016).

As amostras de esgotos domésticos e industriais provêm de residências, edifícios comerciais, empresas etc., e sua composição é formada principalmente por proteínas, carboidrato, óleos e gorduras, além da ureia, pesticidas, surfactantes, fenóis e compostos benzeno, clorados (GARRAFA, 2009).

Devido a isto, após a concentração, as amostras passaram pelo tratamento com Vertrel XF™ que possui a capacidade de remover da amostra ambiental os compostos orgânicos e inorgânicos que interferem na detecção do DNA presente na amostra, já que estes compostos podem inibir tanto as transcriptases reversas quanto as DNA polimerases usadas nas reações de PCR. Outro problema são as proteínas e os carboidratos que podem se ligar a nucleotídeos e íons de magnésio, tornando-os indisponíveis para a polimerase e, consequentemente, inibindo a PCR (QUEIROZ et al., 2001). Além disto, a pureza das amostras garante a fidedignidade dos resultados.

No presente estudo, foram realizados vários testes para avaliar os métodos quanto à sua eficiência de purificação dos concentrados virais das amostras oriundas do esgoto e, para isso, foram utilizados *pools* de amostras já disponíveis no laboratório, conforme pode ser observado nas tabelas 2, 3 e 4. Amostras com valores na razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 são consideradas puras pelo fabricante do espectrofotômetro Nanodrop®. Em relação à presença de fenol e outros contaminantes, todavia, se observarmos a razão 230/280, nenhuma das amostras está adequada, possivelmente devido a resíduo do reagente utilizado na extração de DNA ou algum contaminante natural não removido nas amostras de DNA analisadas.

.

Como observado na tabela 4, a concentração de DNA da amostra de Barueri, de acordo com o NanoDrop®, é suficiente para realizar um sequenciamento, já que o *kit Nextera XT* DNA Illumina® requer 1 ng/µL DNA, de acordo com o Manual do próprio kit. Porém, é necessário analisar a pureza desse material juntamente com a concentração e, neste caso, os dois parâmetros juntos mostram um DNA contaminado, como observado nas razões 260/280 e 230/280

Inicialmente consideramos que o Trizol® seria suficiente para separação das proteínas dos organismos presentes e, consequentemente, para a extração DNA viral, mas esse reagente não foi suficiente para realizar esse processo. A eliminação das proteínas contaminantes se faz necessária porque interferem na quantificação do DNA, como também, mais adiante, na análise metagenômica. Outro problema foi à presença de fenol residual na amostra que também interfere na quantificação do DNA pelo NanoDrop®, como observado na razão 260/280 (tabelas 3 e 4).

A extração de RNA utilizando Trizol-clorofórmio também foi avaliada, embora o RNA não tenha sido alvo no presente estudo. Os resultados (tabela 3) mostraram que das 9 amostras tratadas, nenhuma foi considerada livre de contaminantes. Este inconveniente foi contornado com a síntese do cDNA, quando as amostras se mostraram mais puras. Isso pode ter ocorrido porque para se preparar a mix para a síntese do cDNA o RNA é diluído nos outros reagentes da mix, consequentemente, diluindo os contaminantes.

A baixa eficiência do Trizol para extração pode ser atribuída a dois fatores: a presença de pouco DNA extraído e/ou a presença de contaminantes. O NanoDrop® faz a leitura através de absorção da Ultravioleta (UV) e considera DNA tudo que está dentro do índice de absorbância de 260 nm e 280 nm, sem levar em consideração, se o DNA está fragmentado e se o que está sendo lido dentro o índice de 260 nm e 280 nm é DNA mesmo ou um contaminante qualquer levand, por conseguinte, a obtenção de valores de concentração de DNA maiores do que os que estão realmente presentes na amostra. Devido a quantificação imprecisa do NanoDrop® , optamos em usar o Qubit® 2.0. Esse aparelho, que é um aparelho que lê por fluorometria, funciona usando corantes que possuem uma baixa fluorescência antes da ligação deste com o alvo. O alvo pode ser DNA, RNA ou proteína. Após a ligação do alvo com o fluoróforo, eles se tornam intensamente fluorescentes porque ocorre a intercalação entre as bases do fluoróforo e do alvo, assumindo uma forma mais rígida. A quantificação torna-se possível, pois se coloca quantidades específicas de corante e de DNA e, assim, o aparelho consegue converter a intensidade da florescência em uma medida de concentração de DNA (QUBIT, 2017).

.

Outro processo de extração de DNA utilizado em virologia e avaliado no presente estudo foi o método de Hirt (HIRT, 1967). Com este método pretendia-se separar seletivamente o DNA viral de outros DNAs da amostra. Das 9 amostras purificadas nenhuma foi considerada livre de contaminantes e, ao fazer a quantificação pelo fluorômetro Qubit®, observou-se que a concentração de DNA também não era precisa (tabela 4). No entanto, como observado na análise metagenômica do esgoto de Barueri, embora não tenhamos conseguido eliminar totalmente os contaminantes, ainda conseguimos obter resultados no sequenciamento.

Após a primeira série de análises metagenômicas realizadas nas águas de esgoto da ETE Barueri, foi observado que os métodos de extração utilizados, em associação com diversos procedimentos de purificação das amostras (filtração, tratamento com DNAse, clorofórmio), não foram eficientes o suficiente, possibilitando a amplificação de baixo número de *contigs* virais, além de bacterianos e de arquéias. A presença dos DNAs residuais pode ser justificada pela presença de DNA fragmentado e dissolvido nas amostras, provavelmente, decorrente de lise celular natural no próprio ambiente ou por processamento da amostras (DUTILH et al., 2014).

Assim foram testados dois kits comerciais (*DNEasy Blood and Tissue® e Power Soil DNA isolation®)* Com base nas concentrações de DNA obtidas e no nível de pureza o *kit DNEasy Blood and Tissue®* foi utilizado no presente estudo. Outro *kit* que amplifica os produtos extraídos (*illustraTM Single Cell GenomiPhiTM DNA Amplification®)* foi utilizado logo após as extrações de DNA, e os resultados mostraram que seu uso é recomendável pois realmente possibilitou o aumento da quantidade de DNA, uma vez que atua como *primer* randômico (tabelas 5 e 6) (MIZUNO et al., 2013).

Inicialmente foi testado o sequenciamento pelo sistema Miseq em uma amostra de esgoto de Barueri, mas os resultados foram bem abaixo do esperado, em termos de especificidade e quantidade de contigs gerados. Optamos, então, por partir para o sistema Hiseq por sua alta performance.

De acordo com Bibby et al (2011), os dados gerados pelo sequenciamento de última geração podem gerar grande quantidade de sequências com comprimento curtos que, no presente trabalho, foram sequências que alcançaram, no máximo, a 100 pares de bases e, após a montagem os *contigs* montados, chegaram a 48.000 pb (tabela 7). Dependendo do programa de montagem dos *contigs* e da qualidade de cada *reads*, muitas vezes, a montagem de um genoma incompleto, gera *contigs* errados ou incompletos, podendo induzir, portanto, a

.

classificação errônea dos organismos estudados ou, até mesmo, impedir sua respectiva identificação.

Por este motivo, o programa FastQC, desenvolvido pelo *Babraham Institute*, especializado em testes de qualidade para sequências obtidas de sequenciadores de última geração, é usado como uma ferramenta para análise das estatísticas básicas de sequências (ANDREWS, 2016). São avaliados o número e o tamanho de *reads* gerados, a distribuição de valores de qualidade para cada uma das 100 bases das sequências produzidas pelo Illumina®, conteúdo GC de *reads*, índice de qualidade das sequências (*Phred*), distribuição do tamanho das sequências, níveis de duplicação das sequências, pois as sequências que estão super-representadas podem indicar a presença de adaptadores utilizados no sequenciamento.

De acordo com o fastQC, as sequências obtidas no presente trabalho possuíam adaptadores, que foram retiradas pelo programa cutadapt. A remoção destes adaptadores de *reads,* antes da montagem, é importante, pois eles podem ser incorporados na montagem, gerando, consequentemente, uma montagem errônea dos *contigs* obtidos (ANDREWS, 2016).

Outro parâmetro demonstrado pelo fastQC é a quantidade de GC, esta variável pode dificultar a montagem de genomas dos organismos analisados através da abordagem *de novo* e de referência, por isso é importante que a quantidade de GC não esteja super expressada na amostra (ANDREWS, 2016).

Além da montagem errônea de *contigs,* pode ocorrer também classificação incorreta dos organismos que, por sua vez, pode ser causada pela presença de sequências erradas depositadas no Genbank ou também por sequências virais não documentadas dentro de sequências no genoma de bactérias ou de outros organismos (DUTILH et al., 2014).

Esse problema poderia ser amenizado se os vírus possuíssem marcadores genéticos, como ocorre nas bactérias, as quais possuem o rRNA 16S para a identificação da grande maioria das bactérias (DUTILH et al., 2014).

No presente trabalho, foi utilizado o banco de dados blastx. De acordo com Bibby et al. (2011), esse banco de dados é o mais usado para identificar vírus não patogênicos. Outra possibilidade seria a pesquisa pelos programas blastn ou tblastx, que são programas mais apropriados para anotação de diversidade de patógenos humanos em sequências oriundas do ambiente. Alguns vírus não foram classificados ou podem ter sidos classificados erroneamente. Os erros podem ter sido provocados no momento da tradução do nucleotídeo para aminoácido, na pesquisa pelo blastx, e isso pode ser devido à presença de regiões não codificantes do genoma viral pesquisado (BIBBY et al., 2011).

.

Com base nos aspectos apresentados, *contigs* de 200 pb a 48.555pb foram considerados na análise metagenomica e a maioria mostrou-se similar a vírus, seguido pelas sequências similares de membros de Bacteria e de Archaea. O menor número de *contigs* foi similar a Eukaryota.

5.2. Análise metagenômica

5.2.1 Vírus

No presente trabalho, foram encontradas as seguintes famílias de vírus que infectam os membros de Eukaryota: *Phycodnaviridae, Mimiviridae, Herpesviridae, Iridoviridae, Marseilleviridae, Circoviridae e Parvoviridae* e as famílias de vírus que infectam os membros de Bacteria: *Inoviridae, Microviridae, Myoviridae, Podoviridae, Siphoviridae* (tabela 8). Estas famílias foram encontradas nos quatro pontos de coleta, a exemplo do que ocorreu em outros estudos, como no estudo de Alhamlan et al. (2013) em lagoas, no estudo de Cantalupo; Calgua; Zhao, (2011) em esgoto e em estudo do ar atmosférico (WHON et al., 2012).

Entre os *contigs* obtidos semelhantes a vírus, também foi verificada a presença de duas famílias cujos membros são infecciosos para Archaea: *Lipothrixviridae* e *Bicaudaviridae* (tabela 8). A família *Lipothrixviridae* é formada por vírus filamentosos que são divididos em quatro gêneros: *Alphalipothrixvirus*, *Betalipothrixvirus*, *Gammalipothrixvirus* e *Deltalipothrixvirus*. Os membros da família *Bicaudaviridae* infectam os organismos que pertencem ao filo Crenarchaeota que são hipertermófilas (PIETILÄ et al., 2014).

Dentre as famílias de vírus de eucariotos, quatro não apresentam envoltório (*Phycodnaviridae, Mimiviridae, Marseilleviridae e Circoviridae*), assim como os fagos. Esse resultado era esperado porque este tipo de partícula, normalmente, é mais resistente aos processos naturais de inativação dos ambientes, como radiação ultravioleta, calor, salinidade, etc. (SOBSEY; MESCHKE, 2003). No entanto, foram detectados vírus infecciosos com envoltório, dentre os vírus de eucariotos (*Herpesviridae* e *Iridoviridae*) e de Archaea (*Lipothrixviridae*). Esse resultado também foi observado por Sobsey; Meschke (2003), os quais discutem que possivelmente partículas virais com envoltórios são capazes de persistir durante consideráveis períodos de tempo em resíduos como fezes e outros resíduos oriundos de meios ambientais contaminados. Portanto, os fatores que possibilitam a sobrevivência de vírus com envoltório no ambiente são de grande interesse a saúde pública.

.

No presente estudo foi detectado um grande número de famílias virais, no entanto, estes dados não foram considerados devido o baixo número de *contigs* obtidos destas famílias, pois, dessa forma, poderíamos induzir a erros de interpretação.

Os vírus das famílias *Phycodnaviridae*, infectam algas (VAN ETTEN et al., 2002), e os membros da família *Iridoviridae* podem ter como hospedeiros anfíbios, peixes, invertebrados e insetos (CHINCHAR et al., 2017). São alóctones do ambiente aquático. Estas duas famílias são morfologicamente indistinguíveis por microscopia eletrônica e também são semelhantes quando comparadas geneticamente, com base nos genes que codificam as proteínas do capsídeo (*major capsid proteins* - MCPs). O estudo revelou sete domínios conservados nesta proteína que também são encontrados em pelo menos alguns membros da família *Phycodnaviridae* (TIDONA et al., 1998).

A família *Phycodnaviridae* foi encontrada em lagos (CLASEN; SUTTLE, 2009), em rios (GIMENES et al., 2012) e esgotos (CANTALUPO; CALGUA; ZHAO, 2011) e é uma das famílias mais numerosas no ecossistema aquático (VAN ETTEN et al., 2002). No presente trabalho, esta família foi encontrada tanto nas amostras de mananciais como em esgotos. No entanto, esta família foi mais numerosa nas amostras Gua_Manancial e SL_Manancial, que são ambientes mais preservados que o esgoto (figura 17). Dentre as espécies virais, o vírus de *P. globosa* apresentou o maior número de contigs. A alga hospedeira *P. globosa* já foi descrita no país (BERGESH 2010), inclusive envolvida em florações no sul do Brasil (MAFRA JUNIOR; FERNANDES; PROENÇA, 2006). Outras espécies virais encontradas como *Emiliana huxleyi* vírus (EhV-86), *Micromonas pusilla* virus (MpV1), *Bathycoccus sp*. virus (BpV) são autóctones, frequentemente encontradas em ambientes aquáticos ao redor do mundo (CHEN et al., 1995; WILSON; VAN ETTEN; ALLEN, 2009). Embora as algas hospedeiras destas espécies sejam marinhas, ou toleram certos níveis de salinidade, (GIMENES, 2010), observaram que os ficodnavírus encontrados em águas doces amazônicas são mais próximos filogeneticamente às espécies marinhas do que ao vírus *Paramecium bursaria* Chlorella virus, também de água doce. Este aspecto pode justificar a ocorrência destes vírus em águas de mananciais da RMSP.

A família *Mimiviridae*, a segunda mais numerosa em termos de *contigs*, é infecciosa para protozoários, mais especificamente amebas. São considerados vírus gigantes (Megavirus) e a família é dividida em três grupos: grupo A que inclui Mimivirus e *Mamavirus*, grupo B que inclui os *Moumouvirus* e o grupo C que inclui *Megavirus chiliensis* (GAIA et al., 2014). Além dos *Moumouvirus*, de acordo com a figura 19, a espécie com mais *contigs* montados é a espécie *Cafeteria roenbergensis virus* (CroV) são parasitas do nano-flagelado heterotrófico

.

marinho unicelular denominado *C. roenbergensis* e é o primeiro vírus gigante capaz de infectar zooplâncton. Foi isolado de amostras de água do oeste do Golfo do México (FISCHER et al., 2014).

Dentre os vírus patogênicos para humanos e alóctones ao ambiente aquático foram encontradas sequências dos membros da família *Herpesviridae* em três pontos (tabela 8 e figura 17), exceto do esgoto de Taboão da Serra. Esta observação também foi relatada por (BIBBY; PECCIA (2014). Esta família está subdividida em três subfamílias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* e *Gammaherpesvirinae* (ICTV, 2011). Os vírus herpes simplex 1 e 2 (HSV-1 e HSV-2) da subfamília *Alphaherpesvirinae* são os representantes mais comuns em seres humanos, mas somente o HSV-1 foi detectado nas amostras de água de esgoto de São Lourenço da Serra. Estes vírus possuem a capacidade de estabelecer latência nos gânglios sensoriais do hospedeiro, sendo uma preocupação especialmente para humanos imunocomprometidos, ou quando a carga viral presente no hospedeiro é muito grande (ARDUINO; PORTER, 2006).

O herpesvírus humano 6A (HHV-6A), incluído na subfamília *Betaherpesvirinae,* de acordo com a revisão de Pormohammad et al. (2017) pode está contribuindo com a esclerose múltipla e esse vírus foi detectado nas amostras de água dos mananciais do presente estudo. De acordo com o estudo de Bibby;Peccia (2014) na população onde estudaram o Herpesvírus humano 6A e 6B possui uma taxa de soroprevalência de 85 %, esta taxa se refere a ocorrência de 100% nas 12 amostras de influentes e de efluentes trabalhadas no estudo. No entanto, os autores, também, relatam que ocorre à presença de genes conservados entre o Herpesvírus e o genoma humano, por essa razão para o estudo dos Herpesvius é exigido confirmação adicional.

Além destas espécies, também foram detectadas as espécies *Herpesvirus* Humano tipo 4 (vírus de Epstein-Barr) e *Herpesvirus humano* tipo 8 (vírus do sarcoma de Kaposi). Ambos fazem parte da Subfamília *Gammaherpesvirinae e* possuem como alvo específico as células B e T, permanecendo latentes nos tecidos linfóides (EDELMAN, 2005).

Algumas espécies virais da família Herpesviridae podem ser consideradas autóctones do ecossistema aquático como *Cyprinid herpesvirus* 1 e *Cyprinid herpesvirus* 3, detectadas na amostra Gua_Manancial, podendo infectar peixes e provocar uma taxa de mortalidade alta (HANSON; DISHON; KOTLER, 2011). Herpesvírus de outras espécies animais, que podem ser considerados alóctones, como herpes de equinos, bovinos e de macacos também foram encontrados, mas considerados sem relevância, dado o baixo número de *contigs*.

.

Os vírus da família *Circoviridae* que foram encontrados nos mananciais e nos esgotos no presente trabalho. São vírus que são eliminados nas fezes do hospedeiro, sendo relatados em aves e mamíferos e associados a doenças potencialmente fatais causando, além de danos no sistema linfoide, imunossupressão em animais infectados. Em suínos, este vírus tem sido estudado extensivamente, uma vez que as infecções causam impacto na economia. Infecções por *Circoviridae* em suínos foram relatadas em todo o mundo, incluindo muitos países na Europa, Ásia, além do Canadá, Reino Unido, Nova Zelândia e Estados Unidos. Quanto aos seus hospedeiros, ainda estão sendo estudados (BLINKOVA et al., 2010). Recentemente, no Brasil, foi descrito um novo tipo em fezes humanas (CASTRIGNANO et al., 2013).

A espécie *Po-Circo-like virus 41 foi encontrada* nas amostras de SL_Manancial e de SL_Esgoto. Esta família já foi detectada em amostras de esgoto de São Paulo em um estudo realizado por pesquisadores do Instituto Adolfo Lutz e do Instituto de Ciência Biomédicas da USP durante o ano de 2005 a 2006 (CASTRIGNANO et al., 2017). Outro estudo sugere que o circovírus que pode está circulando no Brasil é oriundo de fezes de morcego (DE SALES LIMA et al., 2015).

A presença de vírus de Archaea e de Bacteria (bacteriófagos) nas amostras foi observado na tabela 8.

Diversos estudos tem demonstrado que os fagos são os vírus presentes em maior concentração nos ecossitemas aquáticos, sendo 15 vezes mais abundantes do que seus hospedeiros bacterianos (SUTTLE, 2007). Os resultados observados tanto nas águas de manancial (5024 *contigs*) quanto nos esgotos (5611 *contigs*) corroboram com a literatura, Predominantemente foram encontrados os fagos da ordem Caudovirales, mas também das famílias *Microviridae* e *Inoviridae*.

A grande abundancia dos fagos está relacionada ao papel que estes vírus vem desempenhando na manutenção do equilíbrio das populações de hospedeiros nos ecossistemas aquáticos e agilização no processo de circulação de nutrientes (HAMBLY; SUTTLE, 2005)

Dentre as espécies vírais encontradas no presente estudo devem ser ressaltadas: *Prochlorococcus phage P-SSM2* e *Synechococcus phage S-SM2*. Embora não tenham sido os mais numerosos em termos de *contigs*, os seus hospedeiros, as cianobactérias unicelulares dos gêneros *Synechococcus* (água doce e marinha) e *Prochlorococcus* (água salgada), estão entre os picofitoplancton mais abundantes dos meios aquáticos globais, e são responsáveis pela produção primária neste ambiente (GILBERT; DUPONT, 2011). O *Synechococcus* marinho já foi encontrado nas águas estuarinas, costeiras e, geralmente, em ambientes mesotróficos (COUTINHO et al., 2016), além de ter sido encontrado em regiões de mangues no Brasil

.

(SILVA et al., 2014). O *Prochlorococcus* também já foi descrito nas plataformas continentais brasileiras (BERGO, 2015).

Os podofagos da espécie *Planktothrix phage PaV-Ld* (figura 22) são parasitas do gênero *Planktothrix* de cianobactérias, que juntamente com outros três gêneros *Microcystis*, *Anabaena*, *Oscillatoria,* são os mais frequentes nos corpos d'água brasileiras (FURTADO, 2007).

Algumas das famílias de fagos como *Podoviridae*, *Myoviridae* e S*iphoviridae,* foram encontradas nos esgotos e nos mananciais deste estudo. Como sabemos, esses micro-organismos são encontrados frequentemente no intestino humano, fazendo parte de nossa microbiota. Hoje, com o avanço dos estudos do microbioma do intestino acredita-se que os fagos são componentes chaves deste ecossistema e a presença ou ausência destes micro-organismos podem estar relacionados com algumas doenças em seres humanos como a diabetes tipo 2, obesidade, doença de Crohn, colite, psoríase, asma, doenças cardiovasculares, câncer colorretal, além de também participar no progresso do HIV (WALLER et al., 2014).

A família Microviridae é constituída por fagos ssDNA, cujos hospedeiros são proteobacteria, *Spiroplasma*, and *Chlamydia* **(**INCARDONA, 2000**).** Mesmo sendo detectados poucos *contigs* da família no presente estudo, Reyes; Gruber, (2016) montaram um genoma completo da subfamília *Alpavirinae* a partir *dos contigs* da amostra do esgoto de Taboão da Serra.

Cabe ressaltar que muitas sequencias virais ssDNA e dsDNA não foram associadas a nenhum vírus conhecido (tabela 8 e figuras 25). Esta observação vem sendo reportada em praticamente todos os estudo metagenômicos (ANGLY et al., 2006; BREITBART et al., 2003; CANTALUPO; CALGUA; ZHAO, 2011)**.** ANGLY et al. (2006) analisaram águas de 68 locais, em quatro grandes regiões oceânicas, e mostraram que 90% das sequências não eram semelhantes, ou não apresentavam similaridades com as sequências depositadas nos bancos de dados atuais. (SUTTLE, 2005) justifica este aspecto pelo fato de que os bancos de dados mundiais disponíveis ainda são pobres em sequências virais.

De acordo com DUTILH et al. (2014), geralmente o estudo de metagenômica tem como resultado muitas sequências desconhecidas, como observado nos resultados do presente trabalho, e que essas sequências normalmente são desconsideradas pelos pesquisadores, no entanto, elas possuem um número significante em relação às sequências adquiridas pelo sequenciamento.

.

Outro estudo, o de Cantalupo; Calgua; Zhao, (2011), considera a possibilidade de que a maioria dos vírus na Terra ainda não foram caracterizados, por isso é importante não descartamos as sequências geradas pelo sequenciamento. Além disso, as águas residuais não tratadas (esgotos) pode ser uma matriz rica para a identificação de novos vírus e para o estudo da diversidade de vírus.

A presença de DNAs não virais nas amostras também foi revelada com o sequenciamento HiSeq. Muitas espécies bacterianas foram encontradas nas amostras, mas de pouca relevância dado o baixo número de *contigs*. Dentre estas cabe salientar a família *Candidatus Brocadiaceae,* encontrada nas amostras SL_Manancial e Gua_Manancial.

As bactérias da família *Candidatus Brocadiaceae* são anaeróbicas, possuem a capacidade de oxidar amônia, tem afinidade ao nitrito e podem crescer em uma temperatura entre 10 a 30 ºC. São considerados organismos ANAMMOX (*ANaerobic AMMonium OXidation*), capazes de fazer a oxidação anaeróbia da amônia. Este processo é importante no ciclo do nitrogênio global (SILVA, 2015). A presença destas bactérias pode ser justificada devido aos lançamentos de esgoto não tratado, rico em matéria orgânica e, consequentemente, em nitrogênio, podendo contribuir para a eutrofização do ecossistema. (CASALI, 2008).

A família *Halobacteroidaceae,* constituída por bactérias anaeróbias estritas e moderadamente halofílicas, normalmente encontradas em sedimentos de lagos e lagoas, foi encontrada na amostra SL_Manancial (7.165 *contigs)*, no entanto, não existem muitos estudos associando essa bactéria ao intestino, embora ela faça parte de um filo Firmicutes, comum no colón do intestino (ZHILINA et al., 2012).

Outra família bacteriana presente nas amostras foi a *Halomonadaceae* detectada nas amostras Gua_Manancial (3.338 *contigs)* e na TS_Manancial (4.868 *contigs).* Esta família é composta principalmente por organismos marinhos moderadamente halofílicos (GUZMÁN et al., 2017). Mesmo tendo sido encontrada no presente estudo em água doce, não há, até o momento, relatos dessa bactéria nem em ambientes de água doce e nem em locais com presença de contaminação ambiental.

Finalmente, a família *Methylocystaceae*, detectada nas águas de manancial, mas predominantemente no Gua_Manancial (149 *contigs*). São bactérias capazes de obter o carbono necessário para sua sobrevivência e energia a partir de metano e metanol. Além disso, são aeróbicas, diferentemente das outras bactérias encontradas no presente trabalho, normalmente são encontradas em sedimentos, como nos estudos do fundo do lago Baikal e em lodo (GAINUTDINOVA et al., 2005; LI et al., 2017).

.

O intestino abriga uma comunidade bacteriana diversa, necessária para a nossa saúde, sustento e bem estar. A colonização por bactérias começa no nascimento e atinge seu clímax com a aquisição de dois grupos dominantes de bactérias anaeróbicas pertencentes aos filos Firmicutes e Bacteroides (BROWNE et al., 2016). Este fato justifica provavelmente a detecção dos firmicutes nas amostras estudadas. Além desse filo, foi detectado membros do filo Proteobacteria, provavelmente porque as amostras desse estudo apresentavam contaminação por fezes.

Anabaena, *Microcystis*, *Planktothrix*, *Aphanizomenon* e *Cylindrospermopsis* são os gêneros de cianobactérias potencialmente produtores de toxinas que ocorrem com maior freqüência no Brasil. Suas espécies, quase todas produtoras de toxinas, são as mais comuns em florações de lagos e reservatórios eutrofizados de todo o país (CASALI, 2008). Os gêneros *Anabaena*, *Microcystis* e *Cylindrospermopsis* foram identificados no presente estudo na caracterização microbiológica das amostras de água (tabela 11). Estes três gêneros estão inseridos na ordem Chroococcales. Sant'Anna et al. (2004) estudaram a biodiversidade de cianobactérias plânctonicas presentes em seis represas do Alto Tietê, incluindo a represa Guarapiranga, e identificaram as espécies potencialmente tóxicas da ordem Chroococcales, provando que esta ordem é a mais comum nas águas de doce de São Paulo.

Com relação ao domínio Archaea foi detectada a família *Halobacteriaceae* somente na amostra SL_Esgoto (825 *contigs*). Esta Archaea halofílica foi encontrada num lago salgado na China, no entanto, ela não é extremamente halofilica e nem metanogênica, mas alguns membros vêm sendo encontrados no intestino e nas cavidades orais humanos (NKAMGA; HENRISSAT; DRANCOURT, 2017), justificando, portanto, sua presença na amostra de esgoto.

Como consequência dos vários procedimentos de purificação das amostras e extração de DNA, os resultados apresentados, no presente trabalho, podem estar subestimados devido à degradação de partículas virais e/ou perda de DNA. Além disto, muitos fagos no ambiente aquático encontram-se em estado lisogênico, só podendo ser detectados após indução (ANGLY et al., 2006). O próprio método de concentração viral tem limitações, favorecendo alguns tipos virais, no caso dos vírus entéricos, e também precisaria ser reavaliado para aplicação em estudos de ecologia viral. Os vírus entéricos, patogênicos para humanos e animais, por sua vez, não foram detectados no presente, uma vez que os mais prevalentes nas águas residuárias e de superfície contaminadas por lançamentos de esgoto como Picornavirus, Rotavírus, Norovírus, Coronavírus, dentre outros, são vírus RNA, não contemplados neste estudo.

.

Apesar destes aspectos, o presente trabalho possibilitou a identificação das sequências de uma grande variedade de vírus autóctones e alóctones, introduzidos por lançamentos de esgoto bruto nos mananciais, contribuindo para o melhor conhecimento dos dois grandes ecossistemas aquáticos da RMSP (Guarapiranga e São Lourenço da Serra). Além disto, a metodologia metagenômica pode levar a descoberta de novos vírus, especialmente dentre as sequências não identificadas. Entretanto é uma metodologia que não deve substituir os métodos clássicos utilizados para pesquisa de patógenos, devido à importância de informações como infectividade e quantidade das partículas virais para fins de avaliação do risco que os patógenos representam para a saúde da população.

.

6 CONCLUSÃO

- A purificação dos concentrados virais e de extração de DNA viral oriundos de esgoto com vistas à análise metagenômica foi realizada e permitiu a detecção vírus dos domínios Eukarya, Bacteria e Archaea.
- A ocorrência de vírus de Eukarya ocorreu nos quatro pontos de coleta, principalmente os vírus de alga, família *Phycodnaviridae* e *Mimiviridae* foram detectadas nos mananciais em maior número de exemplares e menos nos esgotos.
- Família *Circoviridae* foi mais presente nas amostras de esgotos.
- Os *contigs* de fagos foram detectados em grande quantidade, tanto nas amostras de mananciais como de esgoto da RMSP.

.

REFERENCIAS*

ABEDON, S. T.; MURRAY, K. L. Archaeal Viruses, Not Archaeal Phages: An Archaeological Dig. **Hindawi Publishing Corporation**, p. 1-10, 2013.

ABELES, S. R.; PRIDE, D. T. Molecular bases and role of viruses in the human microbiome. **Journal of molecular biology**, v. 426, n. 23, p. 3892–906, 25 nov. 2014.

ALHAMLAN, F. S. et al. Metagenomics-based analysis of viral communities in dairy lagoon wastewater. **Journal of microbiological methods**, v. 92, n. 2, p. 183–8, 15 fev. 2013.

ANDREWS, S. FastQC. **bioinformatics.babraham**, 2016. Disponivel em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.

ANGLY, F. E. et al. The marine viromes of four oceanic regions. **PLoS biology**, v. 4, n. 11, p. 2121–2131, nov. 2006.

APHA. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 22 Ed.Washington DC: 2012.

ARDUINO, P. G.; PORTER, S. R. Oral and perioral herpes simplex virus type 1 (HSV-1) infection: Review of its management. **Oral Diseases**, v. 12, n. 3, p. 254–270, 2006.

AUGUET, J. C. et al. Dynamic of Virioplankton Abundance and Its Environmental Control in the Charente Estuary (France). **Microbial Ecology**, v. 50, n. 3, p. 337–349, 2005.

AUGUET, J. C.; MONTANIÉ, H.; HARTMANN, H. J. Potential Effect of Freshwater Virus on the Structure and Activity of Bacterial Communities in the Marennes-Oléron Bay (France). **Microbiology Ecology**, v. 57, n. 2009, p. 295–306, 2009.

BANG, C. et al. The Intestinal Archaea Methanosphaera stadtmanae and Methanobrevibacter smithii Activate Human Dendritic Cells. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, p. 1–9, 2014.

BARBOSA, J. E. F. et al. Study of Virioplankton Abundance and Morphological Diversi- ty in a Brazilian Coastal Region Influenced by Upwelling System. **Journal of Marine Biology and Aquaculture**, v. 2, n. 1, p. 1–10, 2016.

BEKLIZ, M.; COLSON, P.; SCOLA, B. LA. The Expanding Family of Virophages. **Viruses**, v. 8, n. 317, p. 1–15, 2016.

BELLEGHEM, J. D. V. **jonasdvanbelleghem**, 2017. Disponivel em: <https://sites.google.com/site/jonasdvanbelleghem/bacteriophages>. Acesso em: 08 JUNHO 2017.

---

*De acordo com:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BENCH, SHELLIE R. **Metagenomic characterization of chesapeake bay virioplankton**. 2007. 79p. These (Master of Sciece in Marine Studies) University of Delaware, 2007.

BERGESH, M.. Prymnesiophyceae. In: *Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Vol. 1*. (Forzza, R.C. Eds), Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; **Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. p. 409-415. 2010.

BESSA, V. S. S. Dinâmica de bacterioplâncton durante a ocorrência de bloom de fitoplâncton. 2007, 97f. Dissertação (Mestrado em toxicologia) - Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, Avero, Portugal. 2007.

BERGO, N. M. **Abundância e Distribuição Espacial de Micro-organismos na Plataforma Continental Sudeste e Área Oceânica Adjacente**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2015.

BETTAREL, Y. et al. Viral Activity in Two Contrasting Lake Ecosystems. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 70, n. 5, p. 2941–2951, 2004.

BIBBY, K.; PECCIA, J. Identification of Viral Pathogen Diversity in Sewage Sludge by Metagenome Analysis. **Environmental science e technology**, v. 47, n. 4, p. 1945–1951, 2014.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. Gêneros de algas de águas continentais do Brasil chave para identificação e descrições. Segunda. ed. Brasil: ed. RiMa, 502 p. 2006.

BLINKOVA, O. et al. Novel circular DNA viruses in stool samples of wild-living chimpanzees. **Journal of General Virology**, v. 91, p. 74–86, 2010.

BOUNDLESS MICROBIOLOGY. **Sem limites. "Vírus de Archaea."**, 2016. Disponivel em: <https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/viruses-9/viral-diversity-123/viruses-of-archaea-638-8038>. Acesso em: 07 março 2017.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Decreto Legislativo n. 898, de 18 de dezembro de 1975. Disciplina o uso de solo para a proteção dos mananciais, cursos e reservatórios de água e demais recursos hídricos de interesse da Região Metropolitana da Grande São Paulo e dá providências correlatas. São Paulo,SP, 1975.

BRASIL. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo. Decreto Legislativo n.172, de 17 de novembro de 1976. Delimita as áreas de proteção relativas aos mananciais, cursos e reservatórios de água, a que se refere o Artigo 2.º da Lei n. 898, de 18 de dezembro de 1975, estabelece normas de restrição de uso do solo em tais áreas e dá providências correlatas. São Paulo, SP, 1976.

BRASIL. Assembléia Legislativa do Estado de São Paulo. Decreto Legislativo n. 9866 de 20 de novembro de 1997. Dispõe sobre diretrizes e normas para a proteção e recuperação das bacias hidrográficas dos mananciais de interesse regional do Estado de São Paulo e dá outras providências. São Paulo, SP, 1997.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 518, de março de 2004. Secretaria de Vigilância em

Saúde. Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. Brasília, DF, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria n. 2.914, de 12 de Dezembro de 2011. Dispõe sobre normas de portabilidade de água para o consumo humano. Brasília, DF, 2011.

BREITBART, M. et al. Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces Metagenomic Analyses of an Uncultured Viral Community from Human Feces. **Journal of bacteriology**, v. 185, n. 20, p. 6220–6223, 2003.

BREITBART, M. et al. Diversity and population structure of a near-shore marine-sediment viral community. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, v. 271, n. 1539, p. 565–74, 22 mar. 2004.

BROWNE, H. P. et al. Culturing of "unculturable" human microbiota reveals novel taxa and extensive sporulation. **Nature**, v. 533, n. 7604, p. 543–546, 2016.

CABRAL, A. S. et al. Virioplankton dynamics are related to eutrophication levels in a tropical urbanized bay. **PLoS ONE**, v. 12, n. 3, p. 1–16, 2017.

CAMPOS, F. S. REPLICAÇÃO VIRAL, 2017. Disponivel em: <http://www.ufrgs.br/labvir/material/replicacao_med.pdf>. Acesso em: 2017 maio 10.

CANTALUPO, P. G.; CALGUA, B.; ZHAO, G. Raw Sewage Harbors Diverse Viral Populations. **mBio**, v. 2, n. 5, p. 1–9, 2011.

CARVALHO, M. D. C. et al. **Manual de Cianobactéria Planctônicas:Legislação, Orientações para o Monitoramento e Aspectos Ambientais. CETESB**, 2013.

CASALI, C. A. **Qualidade Da Água Para Consumo Humano Ofertada Em Escolas E Comunidades Rurais Da Região Central Do Rio Grande Do Sul**. 2008. 173p. Dissertação (Mestre em Ciências do Solo) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande de Sul, 2008.

CASTRIGNANO, S. B. et al. Identification of circo-like virus-Brazil genomic sequences in raw sewage from the metropolitan area of São Paulo: Evidence of circulation two and three years after the first detection. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 3, p. 175–181, 2017.

CARON, D. A. et al. The contribution of microorganisms to particulate carbon and nitrogen in surface waters of the Sargasso Sea near Bermuda. **Deep-Sea Reseurch** , v. 42, n. 6, p. 943-972, 1995.

CARTER, J. B. Introduction to bacterial viruses (bacteriophages). In: CARTER, J. B. **Virology:** Principles and Applications. 2. ed. Brasil: ed. Wiley, p. 394. 2013.

CAVICCHIOLI, R. Archaea — timeline of the third domain. **Nature reviews | Microbiology**, 2011. 51-61.

CHANNEL, B. BRASIL CHANNEL. **São Lourenço da Serra - SP**, 2017. Disponivel em: <http://brasilchannel.com.br/municipios/mostrar_municipio.asp?nome=S%C3%A3o+Louren%C3%A7o+da+Serra&uf=SP>. Acesso em: 2017 JULHO 10.

CHEN, F. et al. Amplification of DNA polymerase gene fragments from viruses infecting microalgae. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 4, p. 1274–1278, abr. 1995.

CHÉNARD, C.; WIRTH, J. F.; SUTTLE, C. A. Viruses Infecting a Freshwater Filamentous Cyanobacterium (Nostoc sp .) Encode a Functional CRISPR Array and a Proteobacterial DNA. **mBio**, v. 7, n. 3, p. 1–11, 2016.

CHINCHAR, V.G., HICK, P., INCE, I.A., JANCOVICH, J.K., MARSCHANG, R., QIN, Q., SUBRAMANIAM, K., WALTZEK, T.B., WHITTINGTON, R., WILLIAMS, T., ZHANG, Q., and ICTV Report Consortium. 2017, ICTV Virus Taxonomy Profile: *Iridoviridae,* J**ournal of General Virology**, 98, 890-891.

CLASEN, J. L.; SUTTLE, C. A. Identification of freshwater Phycodnaviridae and their potential phytoplankton hosts, using DNA pol sequence fragments and a genetic-distance analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, p. 991–997, 2009.

COLOMBET, J. et al. Seasonal Depth-Related Gradients in Virioplankton : Standing Stock and Relationships with Microbial Communities in Lake Pavin (France). **Microbial Ecology**, v. 58, p. 728–736, 2009.

COLOMBO, S. Veja, 2015. Disponivel em: <http://vejasp.abril.com.br/cidades/represa-guarapiranga-problemas-ambientais/>. Acesso em: 2017 JULHO 10.

COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS. **ICTV**, 2011. Disponivel em: <https://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/99/asfarviridae&prev=search>. Acesso em: março 20 2017.

COMITÊ INTERNACIONAL DE TAXONOMIA DE VÍRUS- ICTV. **ICTV**, 2011. Disponivel em: <https://translate.google.com.br/translate?hl=pt-BR&sl=en&u=https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/dsdna-viruses-2011/w/dsdna_viruses/99/asfarviridae&prev=search>. Acesso em: março 20 2017.

CONAMA. Resolução n 357, 18 de março de 2005. **Diário Oficial**, n. 053, p. 58–63, 2005.

CONTE, M. D. L.; LEOPOLDO, P. R. **Avaliação de recursos hídricos Rio Pardo, um exemplo**. Unesp. Botucatu, p. 142. 2001.

COUTINHO, F. et al. Comparative genomics of Synechococcus and proposal of the new genus Parasynechococcus. **PeerJ**, v. 4, p. e1522, 2016.

DE SALES LIMA, F. E. et al. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2015. CRAPEZ, M. A. C. Bactérias marinhas. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. Cap. 5, p. 83-102.

CUTOLO, S. A. Comunidade zooplanctônica na represa de Guarapiranga- SP - BRASIL, 1993. Disponivel em: <http://www.bvsde.paho.org/bvsaidis/caliagua/peru/bracca277.pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

DE SALES LIMA, F. E. et al. Genomic characterization of novel circular ssDNA viruses from insectivorous bats in Southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 10, n. 2, p. 1–11, 2015.

DEZOTTI, M. Processos e técnicas para o controle ambiental de efluentes líquidos, Rio de Janeiro, 2008 p.360 ed. E-PAPERS, 2008.

DJIKENG, A. et al. Metagenomic Analysis of RNA Viruses in a Fresh Water Lake. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. 1-14, 2009.

DUTILH, B. E. et al. A highly abundant bacteriophage discovered in the unknown sequences of human faecal metagenomes. **Nature Communications**, v. 5, p. 1–11, 2014.

EARTH-MAPAS, G. earth.google. **Google Earth-Maps**, 29 Julho 2016. Disponivel em: <https://earth.google.com>.

ECKBURG, P. B.; LEPP, P. W.; RELMAN, D. A. Archaea and Their Potential Role in Human Disease. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 2, p. 591–596, 2003.

EDELMAN, D. C. Human herpesvirus 8 – A novel human pathogen. **Virology journal,** v. 2, p. 1–32, 2005.

ENEM, 2011. Disponivel em: <https://sites.google.com/site/biologiaaulaseprovas/ecologia-e-ciencias-ambientais/problemas-ambientais/eutrofizacao>. Acesso em: 21 set. 2016.

ESTEVES, F. D. A.; AMADO, A. M. Nitrogênio. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 13, p. 239-258.

ESTEVES, F. D. A.; CALIMAN, A. Águas continentais: características do meio, compartimentos e suas comunidades. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 7, p. 119-133.

ESTEVES, F. D. A.; MENEZES, C. F. S. Papel da água e da Limnologia na Sociedade moderna. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 3, p. 63-73.

ESTEVES, F. D. A.; PANOSSO, R. Fósforo. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 14, p. 259-282.

ESTEVES, F. D. A.; SUZUKI, M. S. Comunidade Fitoplanctônica. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 21, p. 826.

EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. Procariotos e vírus. In: EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2014. Cap. 13, p. 256-277.

FANCELLO, L.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Computational tools for viral metagenomics and their application in clinical research. **Virology**, v. 434, p. 162-174, dezembro 2012.

FARJALLA, V. F.; AMADO, A. M.; ESTEVES, F. D. A. bACTERIOPLÂNCTON. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3. ed. Rio de janeiro: Interciência, 2011. Cap. 20, p. 826.

FERNANDES, V. D. O.; ESTEVES, F. D. A. Comunidade Perifítica. In: ESTEVES, F. D. A. **Fundamentos de Limnologia**. 3ª. ed. Rio Janeiro: Interciência, 2011. Cap. 22, p. 447-460.

FILÉE, J. et al. Marine T4-type bacteriophages, a ubiquitous component of the dark matter of the biosphere. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 35, p. 12471–12476, 2005.

FISCHER, M. G. et al. The virion of Cafeteria roenbergensis virus (CroV) contains a complex suite of proteins for transcription and DNA repair. **Virology**, v. 466-467, p. 82–94, out. 2014.

FOLHA DE SÃO PAULO. **Cotidiano**, 2016. Disponível em: <http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2016/07/1791148-sabesp-quer-dobrar-captacao-de-agua-do-interior-para-grande-sp.shtml>. Acesso em: 2017 junho 10.

FRANCE-PRESSE. Vírus encontrado em algas altera capacidade mental de humanos. **Ciência e saúde**, 2014. Disponivel em: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2014/11/virus-encontrado-em-algas-altera-capacidade-mental-de-humanos.html>. Acesso em: 20 setembro 2016.

FURTADO, A. L. F. F. **Isolamento , morfologia , análises moleculares e testes toxicológicos de cianobactérias em lagoa facultativa de sistema de estabilização (Cajati-SP)**. 152f. 2007. Tese (Doutorado em Hidráulica e Sanaeamento) - Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo 2007.

GACI, N. et al. Archaea and the human gut : New beginning of an old story. **World Journal Gastroenterology.** v. 20, n. 43, p. 16062–16078, 2014.

GAIA, M. et al. Zamilon, a novel virophage with Mimiviridae host specificity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1–8, 2014.

GAINUTDINOVA, E. A. et al. Aerobic Methanotrophic Communities in the Bottom Sediments of Lake Baikal. **Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 486–494, 2005.

GARCIA-VALLVE, S.; ROMEU, A. Horizontal Gene Transfer in Bacterial and Archaeal Complete Genomes. **Genome Research**, p. 1719–1725, 2000.

GALINARI, G. C. F. **Bacteriófagos em ecossistemas aquáticos**. 2011, 58f. Monografia (Especialização de Microbiologia industrial e ambiental) -Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

GALIZIA, T. J. Jornal da USP. **Custos econômicos da poluição e degradação ambiental no Brasil**, 25 Julho 2016.

GARRAFA, P. **Avaliação da qualidade virológica do efluente doméstico tratado e disponibilizado para reúso na cidade de São Paulo.** 2009. 79f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

GILBERT, J. A; DUPONT, C. L. Microbial metagenomics: beyond the genome. **Annual review of marine science**, v. 3, p. 347–371, 2011.

GIMENES, M. V. **Virioplâncton Na Amazônia : Estudo Da Diversidade Dos Vírus Das Famílias Phycodnaviridae E Myoviridae Nos Rios Negro , Solimões E Cuieira**s. 2010. 120f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

GIMENES, M. V et al. Phylodynamics and movement of Phycodnaviruses among aquatic environments. **The ISME journal**, v. 6, n. 2, p. 237–47, fev. 2012.

GUZMÁN, D. et al. Halomonas andesensis sp . nov ., a moderate halophile isolated from the saline lake Laguna Colorada in Bolivia. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 60, n. 2010, p. 749–753, 2017.

HAKSPIEL-SEGURA, C. et al. Spatial and temporal dynamics of virioplankton in a high mountain tropical reservoir, El Neusa (Cundinamarca, Colombia). **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 341–355, 2017.

HAMBLY, E.; SUTTLE, C. A. The viriosphere, diversity, and genetic exchange within phage communities. **Current Opinion in Microbiology**, v. 8, p. 444–450, 2005.

HANSON, L.; DISHON, A.; KOTLER, M. Herpesviruses that Infect Fish. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 2160–2191, 2011.

HELLER, L.; PADUA, V. L. **Abastecimto de água para consumo humano**. Minas Gerais: UFMG, v. 1, 2006. 859 p.

HENRY, R. et al. variação espacial e temporal da produtividade primária pelo fitoplâncton na represa de Jurumirim (rio Paranapanema, SP). **Brasileira de Biologia**, v. 4, n. 58, p. 571-590, 2008.

HERNDL, G. J. et al. Contribution of Archaea to Total Prokaryotic Production in the Deep Atlantic Ocean. **Appl Environ Microbiol.**, v. 71, n. 5, p. 2303–2309, May 2005.

HIRT, B. Selective Extraction of Polyoma DNA from Infected Mouse Cell Cultures. **Journal of Molecular Biology**, v. 26, p. 365–369, 1967.

HOPKINS, M. Virologia. **Microbiologia e Imunologia On-Line**, 2017. Disponivel em: <http://www.microbiologybook.org/Portuguese/virol-port.htm>. Acesso em: 20 março 2017.

HUSON, D. Megan 5. **Algorithms in bioinformatics**, 2015. Disponivel em: <http://ab.inf.uni-tuebingen.de/software/megan/>.

ICTV. Comitê internacional de taxonomia de vírus. **ICTV**, 2011. Disponivel em: <https://talk.ictvonline.org/ictv-

reports/ictv_9th_report/introduction/w/9th_report_intro/174/virus-properties>. Acesso em: 2017 JUNHO 10.

ICTV. Comitê internacional de taxonomia de vírus. **ICTV**, 2017. Acesso em: 2017 JUNHO 10.

INCARDONA, N. L.; MANILOFF, J. Family *Microviridae*. *In* VAN REGENMORTEL, M. H. V; FAUYQUET, C. M.; BISHOP, D. H. L.; CARSTENS, E. B.; ESTES, M. K.; LEMON, S. M.; MANILOFF, J.; MAYO, M. A.; MCGEOCH, D. J.; Pringle, C. R.; Wickner, R. B. ed. Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Academic Press**, San Diego, p. 277 -284, 2000.

ISGREN, M.; MÅRTENSSON, P. Methane formation in sewer systems by. 2013.
JACQUET, S. et al. Viruses in aquatic ecosystems: important advancements of the last 20 years and prospects for the future in the field of microbial oceanography and limnology. **Advances in Oceanography and Limnology**, v. 1, n. 1, p. 97–141, 2010.

JIAO, N. Z. et al. Natural and Anthropogenic Forcing on the Dynamics of Virloplankton in the Yangtze River Estuary. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 86, n. 3, p. 543–550, 2006.

JOVER, L. F. et al. The elemental composition of virus particles: implications for marine biogeochemical cycles. **Nature Publishing Group**, v. 12, n. 7, p. 519–528, 2014.

JUNGER, P. C. et al. Salinity Drives the Virioplankton Abundance but Not Production in Tropical Coastal Lagoons. **Microbial Ecology**, 2017.

KANG, M.; DUNIGAN, D. D.; ETTEN, J. L. VAN. Chlorovirus : a genus of Phycodnaviridae that infects certain chlorella-like green algae. **molecular plant pathology**, v. 6, n. 3, p. 213–224, 2005.

KOONIN, E. V.; DOLJA, V. V.; KRUPOVIC, M. Origins and evolution of viruses of eukaryotes: The ultimate modularity. **Virology**, v. 479-480, p. 2-25, 2015.

LANG, A. S.; ZHAXYBAYEVA, O.; BEATTY, J. T. Gene transfer agents: phage-like elements of genetic exchange. **Nature Reviews Microbiology**, v. 10, n. 7, p. 472–482, 2012.

LARSEN, J. B. et al. Phylogenetic analysis of members of the Phycodnaviridae virus family, using amplified fragments of the major capsid protein gene. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, p. 3048-3057, Maio 2008.

LAWRENCE, J. G. et al. Imbroglios of Viral Taxonomy : Genetic Exchange and Failings of Phenetic Approaches Imbroglios of Viral Taxonomy : Genetic Exchange and Failings of Phenetic Approaches. **jornal of bacteriology**, v. 184, n. 17, p. 4891–4905, 2002.

LEVASSEUR, A. et al. confers resistance to virophage. **Nature**, v. 531, n. 7593, p. 249–252, 2016.

LI, L. et al. facultatively methylotrophic bacterium. **International Journal of Systematic**

and Evolutionary Microbiology, v. 2, n. 2011, p. 1561–1566, 2017.

LODISH, H. et al. **Biologia Celular e Molecular**. 2ed. ed: REVINTER, p. 1244 , 2002.

LOHBECK, K. T. et al. Functional Genetic Divergence In High Co2 Adapted Emiliania Huxleyi Populations. **Evolution**, v. 67, n. 7, p. 1892–1900, 2013.

LUO, H.; MORAN, M. A. How do divergent ecological strategies emerge among marine bacterioplankton lineages? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 9, p. 577-584, 2015.

LURIE-WEINBERGER, M. N.; GOPHNA, U. Archaea in and on the Human Body : Health Implications and Future Directions. **PLoS Pathogens**, v 11, n. 6, p. 1–8, 2015.

MAFRA JUNIOR, L. L.; FERNANDES, L. F.; PROENÇA, L. A. O. Harmful algae and toxis in paranaguá bay , Brazil: bases for monitoring. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 54, n. 2-3, p. 107–121, 2006.

MARQUES, M. S. **Pesquisa de bacteriófagos de *Helicobacter pylori***. 2011, 45f. Dissertação (Mestre em microbiologia aplicada)- Departamento de Biologia Vegetal, Universidade de Lisboa. Portugal, 2011.

MARTIN, M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing. **EMBnet.journal,** v. 17, n. 1, p. 10–12, 2011.

MATHIAS, C. B.; KIRSCHNER, A; VELIMIROV, B. Seasonal variations of virus abundance and viral control of the bacterial production in a backwater system of the danube river. **Applied and environmental microbiology**, v. 61, n. 10, p. 3734–40, out. 1995.

MEHNERT, D. U. et al. Detection of Rotavirus in Sewage and Creek Water: Efficiency of the Concentration Method. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 1, p. 97–100, 1997.
MEHNERT, D. U.; STEWIEN, K. E. Detection and distribution of rotavirus in raw sewage and creeks in São Paulo, Brazil. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 1, p. 140–3, jan. 1993.

MIDDELBOE, M. Microbial Disease in the Sea: Effects of Viruses on Carbon and Nutrient Cycling. In: **Infectious disease ecology, effects of ecosystems on desease and of disease on ecosystems**, 2 ed., Princeton University Press, Paperback Edition p. 242–259, 2008.

MIZUNO, C. M. et al. Expanding the Marine Virosphere Using Metagenomics. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 12, p. 1–6, 2013.

MONIRUZZAMAN, M. et al. Genome of brown tide virus (AaV), the little giant of the Megaviridae, elucidates NCLDV genome expansion and host–virus coevolution. **Virology**, v. 466, p. 60–70, out. 2014.

MORO, R. S. et al. eterogeneidade espacial do fitoplâncton na represa alagados (Ponta Grossa, PR). **Publicação da UEPG Ciências Biológicas e Saúde**, Ponta Grossa, v. 9, p. 21-30, março 2003.

MÜLLER, C. C.; CYBIS, L. F.; RAYA-RODRIGUEZ, M. T. Monitoramento do Fitoplâncton para a Qualidade da Água de Abastecimento Público — Estudo de Caso de Mananciais do Rio Grande do Sul, 17, n. 2, 2012. 62.

MUNIESA, M.; IMAMOVIC, L.; JOFRE, J. Bacteriophages and genetic mobilization in sewage and faecally polluted environments. **Microb BiotechnolOGY**, v. 4, n. 6 , p. 725–734., Nov 2011.

MUTSAFI, Y. et al. Infection cycles of large DNA viruses: emerging themes and underlying questions. **Virology**, v. 466-467, p. 3–14, out. 2014.

NARIHIRO, T.; SEKIGUCHI, Y. Oligonucleotide primers , probes and molecular methods for the environmental monitoring of methanogenic archaea. **Microbial biotechnology,** v. 4, p. 585–602, 2011.

NISHIMURA, P. Y. **A comunidade fitoplanctônica nas represas Billings e Guarapiranga (Região Metropolitana de São Paulo)**. 2012,149f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de Biociências, São Paulo, 2012.

NISHIMURA, P. Y.; CARLOS, V. M. Ecologia do fitoplâncton: aspectos gerais, 2016. Disponivel em: <http://ecologia.ib.usp.br/portal/index.php?option=com_content&view=article&id=147&Itemid=435.>

NKAMGA, V. D.; HENRISSAT, B.; DRANCOURT, M. Archaea : Essential inhabitants of the human digestive microbiota. **Human Microbiome Journal**, v. 3, p. 1–8, 2017.

PAN, D. et al. Abundance and Distribution of Microbial Cells and Viruses in an Alluvial Aquifer. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1–11, 2017.

PARSONS, R. J. et al. Ocean time-series reveals recurring seasonal patterns of virioplankton dynamics in the northwestern Sargasso Sea. **The ISME Journal**, v. 6, n. 2, p. 273–284, 2012.

SABESP. Estação de Tratamento de Esgoto Barueri. **Companhia de Saneamento Básico do Estado de São Paulo - Sabesp**, 2016. Disponivel em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=56>. Acesso em: 29 novembro 2016.

PEREIRA, G. C. et al. Virioplankton abundance in trophic gradients of an upwelling field. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 4, p. 857–865, 2009.

PEREZ, M. F. **Remoção de fitoplancton e microcistina de águas de abastecimento, pela associaçãodas técnicas de flotação por ar dissolvido e oxidação química com cloro epermanganato de potássio**. 2008, 261f. Tese (Doutorado em Engenharia civil)- Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Carlos, São Paulo. 2008.

PESTER , M.; SCHLEPER, C.; WAGNER , M. O Thaumarchaeota: uma visão emergente de sua filogenia e ecofisiologia. **Curr Opin Microbiol.**, v. 3, n. 14, p. 300-306, 2011.

PETROSINO, J. F. et al. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. **Clinical**

chemistry, v. 55, n. 5, p. 856–66, maio 2009.

PIÉGU, B. et al. Evolutionary relationships of Iridoviruses and divergence of ascoviruses from invertebrate iridoviruses in the superfamily Megavirales. **Molecular Phylogenetics and evolution**, v. 84, n. 2015, p. 44–52, mar. 2015.

PIETILÄ, M. K. et al. Archaeal viruses and bacteriophages: comparisons and contrasts. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 6, p. 334–44, jun. 2014.

PIMENTEL, M. et al. Methanogens in Human Health and Disease. **The American Journal of Gastroenterology Supplements**, v. 1, n. 1, p. 28–33, 2012.

PINA, S. et al. Characterization of a Strain of Infectious Hepatitis E Virus Isolated from Sewage in an Area where Hepatitis E Is Not Endemic. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 11, p. 4485–4488, 1998.

PINHATI, F. R. **Caracterização molecular da população microbiana do lodo de refinaria de petróleo por PCR-DGGE e RAPD**. 2008, 118p. Dissertação (Mestre em Bioquimica) - Departamento de bioquimica, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro. 2008.

PRADO, T. et al. Detection of enteric viruses in activated sludge by feasible concentration methods. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 343–349, 2014.

PORANEN, M. M.; TUMA, R. Self-assembly of double-stranded RNA bacteriophages. **Virus Research**, v. 101, p. 93-100, abriil 2004.

PORMOHAMMAD, A. et al. Relationship of Human Herpes Virus 6 and Multiple Sclerosis: A Systematic Review and Meta-analysis. **Journal of Cellular Physiology**, n. May, p. 1–31, 2017.

PORTAL DO GOVERNO DO ESTADO. **Sistema São Lourenço ajudará na recuperação do Cantareira**, 2015. Disponivel em: <http://www.saopaulo.sp.gov.br/spnoticias/lenoticia2.php?id=240468&c=6>. Acesso em: 02 Agosto 2016.

PRANGISHVILI, D. The Wonderful World of Archaeal Viruses. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 67, p. 565–585, 2013.

PREFEITURA de São Lourenço da Serra. **História da Cidade e História do Padroeiro**, 2011. Disponivel em: <http://www.saolourencodaserra.sp.gov.br/a-cidade/historia-da-cidade.html>. Acesso em: 02 agosto 2016.

QINGHAI, L. et al. Metagenomics Reveals a Novel Virophage Population in a Tibetan Mountain Lake. **Microbes and** Environments. v. 31, n. 2, p. 173–177, 2016.

QUBIT. Qubit® 2.0 Fluorometer, 2017. Disponivel em: <http://www.ebc.uu.se/digitalAssets/176/c_176882-l_3-k_qubitbrochure.pdf>. Acesso em: 2017 março 17.

QUEIROZ, A. P. S. et al. Electropositive Filter Membrane as an Alternative for the

Elimination of PCR Inhibitors from Sewage and Water Samples. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 67, n. 10, p. 4614–4618, 2001.

RAY, J. et al. Finding a needle in the virus metagenome haystack--micro-metagenome analysis captures a snapshot of the diversity of a bacteriophage armoire. **PloS one**, v. 7, n. 4, p. e34238, jan. 2012.

REYES, A.; GRUBER, A. GenSeed-HMM : A Tool for Progressive Assembly Using Profile HMMs as Seeds and its Application in Alpavirinae Viral Discovery from Metagenomic Data. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2016.

ROHWER, F.; THURBER, R. V. Viruses manipulate the marine environment. **Nature**, v. 459, n. 7244, p. 207–212, 2009.

RODRIGUES, L. L. R. **Biodiversidade de Cianobactérias e Algas das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga, SP, Brasil.** 2008, 205f. Dissertação (Mestre em Ciências) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2008.

RONQUI, L. B. **Caracterização Limnológica e Avaliação de Efeitos Ambientais causados por Efluentes de Mina de Urânio sobre populações microbianas planctônicas da Represa das Antas, Caldas (M.G.)**. 2008, 135f. Dissertação (Mestre em Biotecnologia) - Pós-Graduação Interunidades, Instituto Butantan/IPT. São Paulo, 2008.

ROVERI, V. **Recursos Hídricos Eutrofizados**. SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE CIÊNCIAS INTEGRADAS DA UNAERP CAMPUS GUARUJÁ. GUARUJÁ: 2011.

SABESP , 2013. Disponivel em: <http://site.sabesp.com.br/site/interna/Default.aspx?secaoId=43>. Acesso em: 19 dezembro 2016.

SANT'ANNA, C. L. et al. Planktic Cyanobacteria from São Paulo State, Brazil: Chroococcales. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 2, p. 213–227, 2004.

SASSAROLI, A. **Virus da hepatite tipo Apresença e identificação dos genótipos circulantes nas águas de esgoto e de superfície da cidade de São Paulo, Brasil.** 2008, 118f. Tese (Doutorado em Ciências) - Departamento de Microbiologia, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2002.

SÄWSTRÖM, C. et al. Seasonal viral loop dynamics in two large ultraoligotrophic antarctic freshwater lakes. **Microbial Ecology**, v. 53, n. 1, p. 1–11, 2007.

SCIENTIFIC, T. F. NanoDrop 200/200c Spectrophotometer. **NanoDrop**, 2009. Disponivel em: <http://www.mlz-garching.de/files/nanodrop_2000_user_manual.pdf>. Acesso em: 2017 junho 10.

SCOLA, B. LA et al. A Giant Virus in Amoebae. **Science**, v. 299, n. March, p. 13385, 2003.

SERRONHA, A. M.; LOURENÇO, J.; SOBRAL, V. **Vírus Marinhos e seus efeitos Ecológicos e Biogeoquímicos**. 20p. Universidade de Évora, 2005.

SHARMA, V. et al. ScienceDirect Mimivirus inaugurated in the 21st century the beginning of a reclassification of viruses. **Current Opinion in Microbiology**, v. 31, p. 16–24, 2016.

SILVA, A. M. D. **Avaliação da qualidade do Rio São Lourenço, SP, sob influência de estações de tratamento de água e estações de tratamento de esgoto**. 2008, 176f. Tese (Doutorado em Ciências) - Instituto de pesquisa energética e nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SILVA, C. S. P. et al. Phylogeny of culturable cyanobacteria from Brazilian mangroves. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 37, n. 2, p. 100–112, 2014.

SILVA, L. C. F. **Diversidade microbiana de lodo nitrificante aclimatado à altas concentrações salinas**. 2015. 107f. Disertação (Mestrado em Microbiologia agrícola) - Universidade Federal de Viçosa, Minias Gerais, 2015.

SINAENCO. Sinaenco. **Sinaenco**, 2017. Disponivel em: <http://sinaenco.com.br/noticias/sistema-produtor-sao-lourenco-uma-das-maiores-obras-de-saneamento-do-pais-sera-inaugurada-em-2017/>. Acesso em: 2017 julho 10.

SOARES, P. E. T. **Análise de Coevolução entre Mimivirus e seus virófagos Sputnik e Zamilon a partir de suas Assinaturas Genômicas**. 2016. 51f. Monografia (Bacharel em Ciência Biológicas)- Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016.

SOBSEY, M. D.; MESCHKE, J. S. Virus survival in the environment with special attention to survival in sewage droplets and other environmental media of fecal or respiratory origin. **Report for the World Health Organization. Geneva, Switzerland**, p. 70 pages, 2003.

SOARES-GOMES, A.; FIGUEIREDO, A. G. O ambiente marinho. In: PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2002. Cap. 1, p. 1-33.
SUTTLE, C. A. Marine viruses — major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 801–812, 2007.

SUTTLE, C. A. Viruses in the sea. **Nature**, v. 437, n. 7057, p. 356–61, 15 set. 2005.

SUTTLE, C. A. Marine viruses — major players in the global ecosystem. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 801–812, 2007.

SYMONDS, E. M. **Viruses in raw sewage and their potential to indicate fecal pollution in coastal environments**.2008. 73p. Thesis (Master of science college of marine science)- University of South Florida, Florida, 2008.

TAVARES, T. D. M.; PAULA, D. DE; MARTA, W. Vírus entéricos veiculados por água : aspectos microbiológicos e de qualidade da água. **Revista de patologia tropical**, v. 34, n. 2, p. 85–104, 2005.

THINGSTAD, T. F. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. **Limnology and Oceanography**, v. 45, n. 6, p. 1320–1328, 2000.

THOMAS, R. et al. Viral abundance, production, decay rates and life strategies (lysogeny

versus lysis) in Lake Bourget (France). **Environmental Microbiology**, v. 13, n. 3, p. 616–630, 2011.

THOMAZ, S. M. O papel ecológico das bactérias e teias alimentares microbianas em ecossistemas aquáticos. In: POMPÊO, M. L. M. **Perspectivas da Limnologia no Brasil**. São Luís (MA): Gráfica e Editora União, 1999. Cap. 12, p. 198.

TIDONA, C. A. et al. Is the Major Capsid Protein of Iridoviruses a Suitable Target for the Study of Viral Evolution ? **Virus genes**, v. 3, n. 5, p. 59–66, 1998.

TUCCI, A.; SAWATANI, M.; LOPES, R. I. **Espécies descritoras da comunidade fitoplanctônica das Represas Billings (Braço Taquacetuba) e Guarapiranga**. 2005. 18º Reunião anual do Instituto de Botânica.

UYAGUARI-DIAZ, M. I. et al. A comprehensive method for amplicon-based and metagenomic characterization of viruses, bacteria, and eukaryotes in freshwater samples. **Microbiome**, v. 4, n. 1, p. 20, 2016.

VAN ETTEN, J. L. et al. Phycodnaviridae--large DNA algal viruses. **Archives of virology**, v. 147, n. 8, p. 1479–516, ago. 2002.

VAN ETTEN, J. L.; MEINTS, R. H. Giant viruses infecting algae. **Annual review of microbiology**, v. 53, p. 447–494, 1999.

VENTER, J. C. et al. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea. **Science**, v. 304, p. 66-74, 2004.

VIEIRA, A. slides. **vrus-2017**, 2017. Disponivel em: <https://www.slideshare.net/AlessandraVieiradaSi1/vrus-2017>. Acesso em: 2017 JUNHO 10.

VIRALZONE. **2016**. Disponivel em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/34.html>.

WALLER, A. S. et al. Classification and quantification of bacteriophage taxa in human gut metagenomes. **The ISME journal**, v. 8, n. 7, p. 1391–1402, 2014.

WEINBAUER, M. G.; FUKS, D.; PEDUZZI, P. Distribution of Viruses and Dissolved DNA along a Coastal Trophic Gradient in the Northern Adriatic Sea. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 12, p. 4074–82, dez. 1993.

WEINBAUER, M. G.; PEDUZZI, P. Frequency , size and distribution of bacteriophages in different marine bacterial morphotypes. **marine ecology progress series**, v. 108, p. 11–20, 1994.

WHON, T. W. et al. Metagenomic characterization of airborne viral DNA diversity in the near-surface atmosphere. **Journal of virology**, v. 86, n. 15, p. 8221–31, 2012.

WILSON, W. H.; VAN ETTEN, J. L.; ALLEN, M. J. The Phycodnaviridae: The story of how tiny giants rule the world. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 328, p. 1–

42, 2009.

WIRTH, J. F. et al. Development of a genetic system for the archaeal virus Sulfolobus turreted icosahedral virus (STIV). **Virology**, v. 415, n. 1, p. 6–11, 20 jun. 2011.

WITHEY, S. et al. Bacteriophages—potential for application in wastewater treatment processes. **Science of The Total Environment**, v. 339, p. 1-18, MARÇO 2005.

WOMMACK, K. E. et al. Population Dynamics of Chesapeake Bay Virioplankton : Total-Community Analysis by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 65, n. 1, p. 231–240, 1999.

WOMMACK, K. E.; COLWELL, R. R. Virioplankton: viruses in aquatic ecosystems. **Microbiology and molecular biology reviews : MMBR**, v. 64, n. 1, p. 69–114, 2000.

WOMMACK, K. E.; HILL, R. T.; KESSEL, M. Distribution of Viruses in the Chesapeake Bayt. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 58, n. 9, 1992.

YILMAZ, P. et al. Expanding the world of marine bacterial and archaeal clades. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. JAN, p. 1–29, 2016.

YOOSUF, N. et al. Draft genome sequences of Terra1 and Terra2 viruses, new members of the family Mimiviridae isolated from soil. **Virology**, v. 452-453, p. 125–32, mar. 2014.

YUTIN, N.; WOLF, Y. I.; KOONIN, E. V. Origin of giant viruses from smaller DNA viruses not from a fourth domain of cellular life. **Virology**, v. 466-467, p. 38–52, out. 2014.

ZHANG, J. et al. Bacteriophage – prokaryote dynamics and interaction within anaerobic digestion processes across time and space. **Microbiome**, v. 5, n. 57, p. 1–10, 2017.

ZHILINA, T. N. et al. Fuchsiella alkaliacetigena gen. nov., sp. nov., an alkaliphilic, lithoautotrophic homoacetogen from a soda lake. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 62, p. 1666–1673, 2012.

ZHONG, X.; JACQUET, S. Contrasting diversity of phycodnavirus signature genes in two large and deep western European lakes. **Environmental Microbiology**, v. 16, p. 759–773, 2014.

ZOPPAS, F. M. **Estudo da Remoção de nitrogênio em efluentes por nitrificação e desnitrificação simutânea**. 2012, 100f. Dissertação (Mestre em Engenharia) - Departamento de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2012.

ANEXO A

Monitoramento realizado pela Sabesp durante o ano de 2013, no ponto GU 101 - Captação Guarapiranga.

Data	Cianobactéria cel/mL	Microcistina µg/L
07/01/2013	5.556	-
21/01/2013	-	-
04/02/2013	5.969	-
18/02/2013	7.969	-
04/03/2013	3.753	-
18/03/2013	-	-
08/04/2013	-	-
22/04/2013	-	-
06/05/2013	2.488,6	-
20/05/2013	7.397,0	-
10/06/2013	7.078,4	-
24/06/2013	4.482,8	-
01/07/2013	-	-
15/07/2013	6.275,4	-
29/07/2013	16.361,2	<0,1
12/08/2013	3.502,2	-
26/08/2013	11.414,4	-
09/09/2013	5.396,6	-
25/09/2013	10.990,6	<0,15
07/10/2013	3.417,9	-
21/10/2013	4.261,3	-
11/11/2013	1.380,8	-
25/11/2013	13.494,7	-
02/12/2013	5.011,6	
16/12/2013	10.333,1	153,7

Fonte: SABESP (2013).
*Os pontos de coletas analisados nesta tabela não são os pontos onde foram realizado o estudo.
**Número Mais Provável (NMP).