



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

Centro de Ciências da Saúde

Programa de pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos

Phillipe Rosado Magalhães

**Manipulação de microrganismos benéficos para corais**

Rio de Janeiro  
2017

Phillipe Rosado Magalhães

## **Manipulação de microrganismos benéficos para corais**

Trabalho de conclusão de curso de mestrado desenvolvido no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) – Instituto de Microbiologia Paulo de Góes e submetido ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dra. Raquel Silva Peixoto

Co-orientador: Prof. Dr. Alexandre Soares Rosado

Rio de Janeiro  
2017

### CIP - Catalogação na Publicação

M188m Magalhães, Phillippe  
Manipulação de microrganismos benéficos para corais / Phillippe Magalhães. -- Rio de Janeiro, 2017.  
104 f.

Orientadora: Raquel Peixoto.  
Coorientadora: Alexandre Rosado.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2017.

1. BMC. 2. Pocillopora damicornis. 3. Vibrio coralliilyticus. 4. Consórcio. I. Peixoto, Raquel, orient. II. Rosado, Alexandre , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

PHILLIPE ROSADO MAGALHÃES

Manipulação de microrganismos benéficos para corais.

Dissertação de Mestrado curso submetido ao curso de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2017.

---

(Raquel Silva Peixoto, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> IMPG, UFRJ – orientadora)

---

(Alexandre Soares Rosado, Prof. Dr. IMPG, UFRJ – co-orientador)

---

(Flávia do Carmo, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> IMPG, UFRJ)

---

(Marinella Laport, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> IMPG, UFRJ)

---

(Andrew Macrae, Prof. Dr. IMPG, UFRJ)

## **Agradecimentos**

De início, antes de começar qualquer agradecimento, gostaria de pedir a todos pensamentos positivos e muita oração pelo meu primo Jorge Magalhães, que está internado desde a primeira semana de janeiro desse ano vítima de duas facadas. Seu estado de saúde é estável, porém ainda está com insuficiência renal grave, além de já ter passado por 3 ou 4 cirurgias. Vai ficar tudo bem primo, te amo!

Pessoas para agradecer a esses dois anos de mestrado é o que não faltam, foram dois anos intensos, com muita correria, prazos apertadíssimos e dezenas de viagens à Búzios devido a projetos (nada de férias, apenas trabalho rsrs). Porém, é claro que também foram feitas muitas amizades, muitos conhecimentos adquiridos, aprendizagem e várias parcerias excelentes fechadas. Emoções não faltaram.

Portanto, gostaria de agradecer primeiramente às duas pessoas que abriram as portas e me deram a chance de participar e de viver isso tudo nos últimos dois anos, não são apenas meus chefes, mas também meus familiares pelo qual tenho um carinho sem igual, Raquel Peixoto e Alexandre Rosado, obrigado de verdade por tudo, sem vocês nada disso se quer teria começado.

É claro, a toda equipe do LEMM que são pessoas maravilhosas, todos tiveram uma mão, as vezes duas ou até mesmo meio corpo no meu projeto de mestrado. Edir e Marcos pelas histórias, risadas e bate papos na hora do almoço. Denise Bigudinho por ser uma das pessoas mais engraçadas e felizes que conheci na vida, além de me salvar com as sequencias dos meus isolados. Deborah, agradeço demais por toda ajuda, principalmente nos últimos meses antes da minha defesa pelas análises de bioinformática. Helena, por ser uma das pessoas mais cabeça dura existente nesse planeta, mas que sempre faz o certo, além de sempre está de bom humor com um sorriso no rosto. Gustavo, por fazer parte daquele meio corpo do meu projeto, me auxiliando na montagem do mesocosmo, ajudando com os corais, além de ter um papel fundamental na parceria com AquaRio. Ângela, Erika, Júnia, João, Yuri, Henrique, Fernanda, Rodrigo, Caren, Zé e todos os alunos de iniciação científica, obrigado de verdade por tudo, todos tiveram alguma influência nesse projeto, mesmo que pequena, mas que se eu fosse falar de cada um não acabaria de escrever nunca. Com certeza estou esquecendo alguém, não é por mal, mas quem me ajudou sabe que o fez e tenho imenso carinho por isso.

À minha banca examinadora da dissertação, agradeço imensamente por fazerem parte dessa conclusão de curso, professores: Marinella Laport, Cátia Barbosa, Andrew Macrae, Caio Rachid e Flávia do Carmo. Fico muito feliz pelo privilégio de poder contar com suas críticas e observações visando sempre melhorar e amadurecer o projeto como um todo.

Às pessoas que me ajudaram com os corais, seja doando ou vendendo, sem vocês não teria começado o experimento. Bernardo da Aqua Rio&Mar, Leonardo Carvalho de Nova Friburgo, Igor Albergaria do Coral Vício, Marcelo Cunha da Barra da Tijuca e Robson Aragão da AquaPet. Muito obrigado por tudo e que continuem sendo aquaristas, cuidando desse pedacinho deslumbrante de recife que conseguimos manter em casa.

Cássia e Mehdi, se já foi complicadíssimo com a ajuda de vocês no experimento em Búzios, sem vocês simplesmente não teria acontecido e não teríamos tido esse resultado surpreendente que tivemos. Obrigado pelos 3 meses, que apesar do cansaço, gritaria, correria, as vezes brigas, risadas e diversão, tudo deu certo no final e vamos desfrutar desses resultados por muito tempo.

Deixando um pouco de lado o profissional e caminhando para o pessoal, nunca poderia deixar de escrever aqui meus agradecimentos à pessoa na qual conheço a um pouco mais de 1 ano, mas que mudou minha vida completamente para melhor nesse curto espaço de tempo, que me ajudou me ouvindo, me dando conselhos e que conversava comigo até horas da madrugada durante um dos momentos mais “perrengues” do projeto que foram os 3 meses isolado em Búzios. Minha linda namorada, Beatriz Morgantini, um imenso obrigado, te amo para sempre!

Por fim, não menos importante, muito pelo contrário, aos meus pais e familiares que me proporcionam ter essa vida feliz e estável. Tenho tudo de bom nela devido a vocês. Pai, mãe, irmã, Jake e família em geral, amo todos vocês e obrigado por estarem sempre do meu lado não importa o que aconteça.

*“Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Se estamos possuídos por uma inabalável determinação conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho. ”*

**Dalai Lama**

## RESUMO

Os corais escleractíneos, responsáveis pela formação dos recifes, vêm sofrendo grandes deteriorações devido a diversas ameaças globais, tais como o aumento gradual da temperatura e a acidificação dos oceanos. Todas essas ameaças influenciam negativamente na homeostase do coral, alterando sua comunidade microbiana simbiótica e por consequência, causando branqueamento e o surgimento de doenças por patógenos oportunistas. A partir disso, esse estudo teve como objetivo a criação de uma nova estratégia de defesa aos corais através da manipulação de um consórcio formado por microrganismos benéficos para corais (BMC), que são microrganismos que possuem características que beneficiam o coral frente a esses estresses. Inicialmente, fragmentos do coral *Pocillopora damicornis* foram macerados e deles extraídos um total de 159 isolados bacterianos. Destes, 19 foram selecionados com base nas características que BMCs teoricamente devem apresentar, entre elas: serem catalase positivas, e/ou apresentarem papel no ciclo do nitrogênio via fixação de nitrogênio e/ou desnitrificação, e/ou no ciclo do enxofre via degradação de dimetilsulfopropionato (DMSP), e/ou possuírem atividade antagonista à *Vibrio coralliilyticus*, patógeno modelo nesse estudo. Após o sequenciamento do DNA da subunidade 16S do RNA ribossomal (gene *rrs*) desses 19 isolados, as estirpes previamente descritas na literatura como patógenos foram excluídas e 7 estirpes foram selecionadas para compor o consórcio. O consórcio selecionado foi utilizado em um experimento em mesocosmo, onde 5 tratamentos diferentes foram testados em duas temperaturas distintas (25 e 30°C). Para validar a importância do consórcio e seu papel na proteção dos corais, foi realizada a quantificação da capacidade fotossintética (Fv/Fm) das zooxantelas presentes nos corais e a observação morfológica dos fragmentos. Os resultados demonstraram que o consórcio de BMCs teve efeito significativo na proteção dos corais frente ao estresse de temperatura e de presença de patógeno. Os corais tratados com consórcio apresentaram uma menor queda do Fv/Fm, além de morfologicamente estarem mais saudáveis quando comparado com os corais que tiveram o tratamento com patógeno. Em conclusão, os dados gerados nesse trabalho proporcionam a criação de uma tecnologia inédita e ainda muito pouco estudada que é a manipulação de BMCs, com intuito de contribuir de forma significativa para a saúde de corais em situações de estresse.

**Palavras-chave:** BMC, *Pocillopora damicornis*, *Vibrio coralliilyticus*, consórcio.

## ABSTRACT

Scleractinian corals, which are involved in building reefs, have been severely deteriorated due to a number of global threats, such as temperature increases and ocean acidification. All these threats negatively influence coral homeostasis, altering its symbiotic microbial community and, consequently, causing bleaching and disease emergence by opportunistic pathogens. This study aimed to develop of a new defense strategy for corals through the manipulation of a consortium of beneficial microorganisms for corals (BMC). Initially, fragments of the coral *Pocillopora damicornis* were macerated and 159 bacterial strains were isolated. Among these isolates, 19 were selected for BMC features, such as being positive catalase, and/or in the nitrogen cycle via nitrogen fixation and/or denitrification, and/or in the sulfur cycle via dimethylsulfopropionate (DMSP) degradation, and/or having antagonistic activity against the *Vibrio coralliilyticus*, pathogen model of this study. After rRNA gene sequencing, 7 strains were selected to compose the BMC consortium. This consortium was tested in a mesocosm experiment, where 5 different treatments were applied at two different temperatures (25 and 30°C). To validate the efficiency of the consortium and its role in the protection of corals, the coral zooxanthellae photosynthetic capacity (Fv / Fm) and the morphological observation of the fragments were evaluated. The results showed that the BMCs consortium had a significant effect on the corals protection against temperature stress and presence of pathogens. The corals that were treated with a consortium showed a lower Fv/Fm drop, in addition to being morphologically healthier when compared to the corals that had the pathogen treatment. In conclusion, the data generated in this study indicate that BMCs, can significantly contribute to the development of sustainable and efficient strategies for coral protection and recovery.

**Key words:** BMC, *Pocillopora damicornis*, *Vibrio coralliilyticus*, consortium.

## LISTAS DE FIGURAS

**Figura 1:** Distribuição de microrganismos nos tecidos dos corais. As zooxantelas são destacadas em cor verde no interior da gastroderme. Os microrganismos de outros grupos taxonômicos, como bactérias, arqueias, fungos, protozoários e vírus, encontram-se destacados em roxo. Esquema adaptado de Rosenberg et al. (2007).....Pág. 20.

**Figura 2:** Possíveis papéis e relações entre corais e seus grupos simbiotes. Extraído e modificado de PEIXOTO et al., submetido.....Pág. 23.

**Figura 3:** Doenças de coral. (A) “White Band II” em *Acropora cervicornis*; (B) “Yellow Band” em *Montastraea faveolata*; (C) BBD em *Diploria labyrinthiformis*; (D) “White Pox” em *Acropora palmata*; (E) Aspergilose em *Gorgonia ventalina*.....Pág. 28.

**Figura 4:** Corais coletados para o comércio.

Fonte: <https://www.reefs.com/blog/2016/02/16/indonesian-coral-collection-rules-abuse/> .....Pág. 31.

**Figura 5:** Mini aquário de recife. Crédito fotográfico à Jake Adams. Extraído de RHYNE & TLUSTY, 2011.....Pág. 32.

**Figura 6:** Colônia de *Pocillopora damicornis*. Crédito fotográfico à Leonardo Carvalho.....Pág. 34.

**Figura 7:** Tratamento do coral com BBD através da remoção do tapete microbiano com auxílio de um aspirador subaquático. (M) Tapete polimicrobiano que causa BBD; (N) Esqueleto exposto do coral morto.....Pág. 36.

**Figura 8:** Fluxograma das atividades realizadas na metodologia.....Pág. 41.

**Figura 9:** Coleta do coral *Pocillopora damicornis* e da água circundante em Nova Friburgo – RJ. A, muda de *P. damicornis*. B, foto com Leonardo Carvalho. C, coleta de água do aquário com a garrafa de vidro. D, início da fragmentação do coral com auxílio do alicate de corte.....Pág. 42.

**Figura 10:** Materiais utilizados para coleta dos fragmentos de coral. A, álcool 70%, alicate de corte, pinça, isqueiro, garrafa de vidro e tubos falcon. B, fragmentos de *P. damicornis* estocados em tubo falcon. C, materiais estocados em isopor utilizado para transporte. D, início da fragmentação do coral com auxílio do alicate de corte. ....Pág. 43.

**Figura 11:** Representação em 3D do banho-maria utilizado no experimento gerada com auxílio do programa SketchUp 2015.....Pág. 50.

**Figura 12:** Representação em 3D do aquário utilizado no experimento gerada com auxílio do programa SketchUp 2015.....Pág. 50.

- Figura 13:** Estrutura completa utilizada na rodada experimental. 1: estrutura de madeira para suporte das caixas de 26 litros. 2: caixas de 26 litros utilizadas para circulação de água. 3: canos de PVC para distribuição de ar para cada aquário. 4: sombrite utilizado para diminuir a incidência de luz sobre o mesocosmo.....Pág. 51.
- Figura 14:** Estrutura de ligação de mangueiras em cada aquário. A, mangueiras azuis: saída de água do aquário para a caixa de 26 litros. B, mangueira de silicone abaixo: era ligada à bomba de água dentro da caixa e servia como entrada de água nos aquários. C, mangueira de silicone acima: saída de ar.....Pág. 52.
- Figura 15:** Aquário particular de criação de corais do aquarista Marcelo Cunha. Colônias de *P. damicornis* com cor roxa dentro do círculo foram doadas para o experimento.....Pág. 54.
- Figura 16:** Uma das diversas colônias de *P. damicornis* adquiridas na loja Aqua Rio&Mar em Cabo Frio – RJ.....Pág. 55.
- Figura 17:** Fragmentos colados com auxílio de cola de secagem rápida no azulejo.....Pág. 55.
- Figura 18:** Esquema dos aquários no experimento de aumento de temperatura.....Pág. 56.
- Figura 19:** Esquema dos aquários no experimento com adição de patógeno. Pág. 57.
- Figura 20:** Representação do cronograma do experimento.....Pág. 58.
- Figura 21:** Esquema dos aquários e tratamentos de ambos os experimentos de temperatura e patógenos juntos.....Pág. 59.
- Figura 22:** Inoculação do consórcio sobre os corais.....Pág. 60.
- Figura 23:** Esquema montado para tirar as fotos dos fragmentos dos corais. 1: mesa para apoio do aquário. 2: papel preto colocado atrás do aquário. 3: aquário utilizado para pôr os azulejo (s) com os fragmento (s) de coral.....Pág. 63.
- Figura 24:** Curvas de crescimento das estirpes do consórcio, em função dos valores obtidos para: A, logaritmo na base 10 do número de células viáveis por ml e B, densidade óptica ao longo de 48 horas de incubação.....Pág. 71.
- Figura 25:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4) e controle (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 72.
- Figura 26:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio remediação (n=4) e controle (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 73.
- Figura 27:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4), controle (n=4) e consórcio remediação (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 74.

**Figura 28:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 74.

**Figura 29:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio remediação (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 75.

**Figura 30:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos patógeno + consórcio (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 76.

**Figura 31:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* de todos os tratamentos a 25°C, ao longo de 28 dias.....Pág. 77.

**Figura 32:** Imagens comparativas dos corais *P. damicornis* no início e no fim do experimento de manipulação de microrganismos benéficos para corais na temperatura de 30 °C. As imagens retratam dois fragmentos de *P. damicornis* por tratamento. Todas imagens com número 1 foram fotografadas no dia 13 do experimento e todas as imagens com número 2 foram fotografadas no dia 38 do experimento. A1 e B1: controle antes; A2 e B2: controle depois; C1 e D1: consórcio prevenção antes; C2 e D2: consórcio prevenção depois; E1 e F1: consórcio remediação antes; E2 e F2: consórcio remediação depois; G1 e H1: patógeno + consórcio antes; G2 e H2: patógeno + consórcio depois; I1 e J1: patógeno antes; I2 e J2: patógeno depois.....Pág. 78.

## LISTAS DE TABELAS

**Tabela 1:** Exemplos de características propostas para BMC (Microrganismos benéficos para corais) e potenciais mecanismos. Extraído e modificado de PEIXOTO et al., submetido.....Pág. 25.

**Tabela 2:** Resultado das análises da seleção dos BMCs nos isolados do coral. Prefixo no código: M - isolado do coral de Nova Friburgo – RJ; e C - isolado do coral de Peruíbe – SP.....Pág. 65.

**Tabela 3:** Resultado das análises da seleção dos BMCs nos isolados da água do aquário. Prefixo no código A - isolado da água do aquário de Nova Friburgo – RJ; e AS - isolado da água do aquário de Peruíbe – SP.....Pág. 66.

**Tabela 4:** Características e classificação dos isolados baseando-se na identidade da sequência mais similar encontrada no *GenBank* utilizando-se o NCBI-BLASTn.....Pág. 67.

**Tabela 5:** Densidade óptica do meio de cultura e número de células viáveis por ml das estirpes do consórcio ao longo de 48 horas de incubação a 26 - 28°C.....Pág. 70.

## LISTAS DE ABREVIATURAS

µl: Microlitro (s).

µmol: Micromolar.

AHLs: *N*-acil homoserina lactonas

ATCC: *American Type Culture Collection*.

BBD: *Black Band Disease*

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*.

BMC: *Beneficial Microorganism for Coral*

BSA: Albumina sérica bovina.

CaCO<sub>3</sub>: Carbonato de Cálcio.

CENPES: Centro de Pesquisas e Desenvolvimento Leopoldo Américo Miguez de Mello

Cp: Consórcio prevenção

CPH: *Coral Probiotic Hypothesis*

Cr: Consórcio remediação

CTL: Controle

D: *Damping*

DGGE: *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*

DMSP: Dimetilsulfoniopropionato

DMSZ: *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH*

DNA: Ácido desoxirribonucleico.

DO: Densidade óptica.

EMO: Espécies marinhas ornamentais.

EROs: Espécies reativas de oxigênio

FAO/WHO: *Food and Agriculture Organization of the United Nations*

Fm: Fluorescência máxima.

Fo: Fluorescência mínima.

FS: Fotossistema.

Fv: Fluorescência variável.

G: *Gain*

HP: *HorsePower*

ISAPP: *Intl Scientific Assoc for Probiotics and Prebiotics*

ISCSS: Instituto Superior de Ciências da Saúde do Sul

JBL: *James Bullough Lansing*  
kb: Quilo base.  
LB: *Luria Bertani Broth*.  
LED: *Light Emitting Diode*  
LEMM: Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular.  
m: Massa.  
MA: *Marine Ágar*.  
MAA: aminoácidos tipo micosporina  
MB: *Marine Broth*.  
mg: Miligrama (s).  
MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio.  
MI: *Measuring Light Intensity*  
min: Minuto (s).  
ml: Mililitro (s).  
mm: Milímetro (s).  
mM: Micromolar.  
NaCl: Cloreto de Sódio.  
NCBI: *National Center for Biotechnology Information*  
ng: Nanograma (s).  
nm: Nanômetro (s).  
NOAA: *National Oceanic and Atmospheric Administration*  
P: Patógeno  
PC: Patógeno + Consórcio  
PCR: *Polymerase Chain Reaction*  
PGPR: *Plant Growth Promoting Rhizobacteria*  
pH: Potencial hidrogeniônico.  
ppm: Parte por Milhão.  
PVC: Policloreto de Polivinila  
qPCR: *Quantitative Polymerase Chain Reaction*  
QS: Quorum sensing  
RDP: *Ribosomal Database Project*.  
RNA: Ácido ribonucleico.  
RNAr: Ácido ribonucleico ribossomal.  
rpm: Rotação por minuto.

*rrs*: Gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal.

SEBRAE: Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas.

SI: *Saturation Pulse Intensity*

SW: *Saturation Pulse Width*

TAE: Tris/Acetato/EDTA.

TBE: Tris/Borato/EDTA.

TBP: *Tetrabromopyrrole*

TDA: Ácido tropoditiético

U: Unidade (s).

UFC: Unidade Formadora de Colônia.

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro.

UNEP: *United Nations Environment Programme*.

UV: Ultravioleta.

v: Volume.

W: *Watts*.

WS: *White Syndrome*.

YBD: *Yellow Band Disease*.

## SUMARIO

1. <b>INTRODUÇÃO</b> .....	19
1.1 Corais.....	19
1.2 Microbiologia em corais.....	21
1.3 Microrganismos Benéficos para Corais ( <i>Beneficial Microorganisms for Corals, BMC</i> ).....	24
1.4 Doenças de corais.....	26
1.5 Aquarismo e sua importância.....	28
1.6 Indústria do aquarismo: aquacultura.....	29
1.7 Aquariologia como ferramenta científica.....	32
1.8 Doenças de corais em aquários.....	32
1.9 <i>Pocillopora damicornis</i> .....	33
1.10 <i>Vibrio coralliilyticus</i> .....	34
1.11 Possíveis tratamentos.....	35
2. <b>JUSTIFICATIVA</b> .....	39
3. <b>OBJETIVO</b> .....	40
3.1 Etapas.....	40
4. <b>METODOLOGIA</b> .....	41
4.1 Coleta dos fragmentos do coral <i>Pocillopora damicornis</i> e da água circundante..	41
4.2 Plaqueamento e isolamento dos microrganismos.....	43
4.3 Estocagem dos isolados.....	44
4.4 Seleção dos microrganismos benéficos para corais.....	44
4.4.1 Presença de substâncias antimicrobianas (teste de antagonismo).....	44
4.4.2 Teste da catalase .....	45
4.4.3 Presença de genes relacionados a fixação de nitrogênio, desnitrificação e degradação de DMSP.....	46
4.5 Extração de DNA Genômico.....	47
4.6 PCR e Sequenciamento de DNA.....	47
4.7 Seleção do consórcio de BMCs.....	48
4.8 Curva de crescimento dos isolados.....	48
4.9 Preparo do consórcio de BMCs.....	49
4.10 Estrutura de mesocosmo para rodada experimental.....	49
4.11 Aquisição dos patógenos.....	53
4.12 Aquisição e fragmentação dos corais.....	54
4.13 Rodada experimental.....	56

4.13.1	Experimento de aumento de temperatura.....	56
4.13.2	Experimento com adição de patógeno.....	56
4.13.3	Cronograma do experimento e visão geral do desenho experimental.....	57
4.14	Aplicação do consórcio e do patógeno.....	59
4.15	Análises dos parâmetros físico-químico da água.....	61
4.16	Avaliação da saúde dos corais.....	61
4.16.1	Quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas.....	61
4.16.2	Observação morfológica do coral.....	62
4.17	Análise estatística dos dados.....	63
5.	<b>RESULTADOS</b> .....	64
5.1	Isolamento dos microrganismos.....	64
5.2	Seleção dos microrganismos benéficos para corais.....	64
5.3	Sequenciamento de DNA dos isolados e montagem do consórcio.....	66
5.4	Curva de crescimento das estirpes.....	68
5.5	Parâmetros físico-químicos da água.....	71
5.6	Avaliação da saúde dos corais.....	72
5.6.1	Quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas.....	72
5.6.2	Observação morfológica do coral.....	77
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	80
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	87
8.	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	88

## 1. INTRODUÇÃO

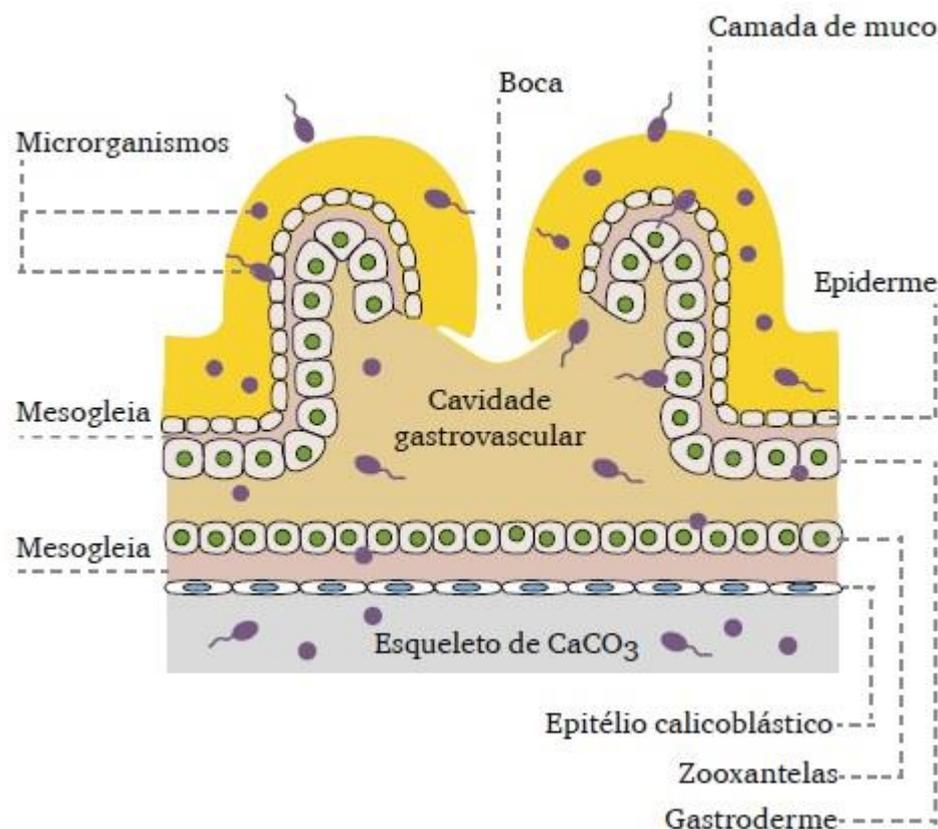
### 1.1 Corais

Os corais são animais que vivem em forma de colônias e são compostos por pólipos geneticamente idênticos. Pólipos são indivíduos muito pequenos com geralmente alguns milímetros de diâmetro (VERON, 2000) e são formados por uma cavidade gastrovascular, uma camada de muco na superfície e seu esqueleto de carbonato de cálcio (Figura 1). Os corais escleractíneos, ou seja, que possuem esqueleto calcários são os responsáveis pela formação de imensas estruturas rochosas tridimensionais localizadas nos oceanos tropicais oligotróficos, chamada recife de corais (GUEST et al., 2012). Dentre todos os habitats marinhos, os ecossistemas de recifes de corais são os que suportam e apresentam maior biodiversidade de organismos marinhos (ROSENBERG et al., 2009; STELLA et al., 2011; GRAHAM & NASH, 2013), embora ocupem menos de 0,1% dos oceanos na Terra, servem como habitat para cerca de 25% das espécies marinhas de todo o mundo (SPALDING et al. 2001).

O coral é um complexo consórcio composto por organismos eucariotos, procariotos e acelulares (vírus). A relação simbiótica mais bem descrita dos corais é a com algas dinoflageladas pertencentes ao gênero *Symbiodinium*, também chamadas de zooxantelas, no qual estão localizadas dentro das células gastrodermais dos corais (ROSEMBERG et al., 2007a; MAIA NETO et al., 2009). As zooxantelas produzem compostos orgânicos oriundos do processo de fotossíntese que contribui significativamente para a nutrição do coral animal, cerca de 90% do carbono e nitrogênio assimilado fotossinteticamente pelas zooxantelas são transferidos ao hospedeiro coral (TREMBLAY et al., 2012) e utilizadas por ele no crescimento, reprodução, respiração e biocalcificação (DAVY et al., 2012), enquanto este, confere às algas abrigo e proteção contra predadores (MAIA NETO et al., 2009).

A camada de muco presente na superfície dos tecidos dos corais é produzida por células secretórias (GARREN & AZAM, 2012) e formado por altas concentrações de proteínas, polissacarídeos e lipídeos. O muco do coral possui diversas funções, tais como sendo a primeira linha de defesa contra patógenos e serve como armadilha

para a captura de alimento, além de criar um ambiente propício ao desenvolvimento e crescimento de bactérias (DUCKLOW & MITCHELL, 1979; BROWN & BYTHELL, 2005; SHNIT-ORLAND & KUSHMARO, 2009), que compartilham semelhanças com a composição bacteriana encontrada na água do mar (LEMA et al., 2012). Estudos recentes apontam também o envolvimento do muco dos gametas de corais como uma possível via de transferência de simbiontes (*Symbiodinium* e espécies de bactérias) da colônia parental às suas larvas (CEH et al., 2012, 2013; SHARP et al., 2012).



**Figura 1:** Distribuição de microrganismos nos tecidos dos corais. As zooxantelas são destacadas em cor verde no interior da gastroderme. Os microrganismos de outros grupos taxonômicos, como bactérias, arqueias, fungos, protozoários e vírus, encontram-se destacados em roxo. Esquema adaptado de Rosenberg et al. (2007).

Os recifes de corais possuem alto interesse econômico, sendo fornecedor de alimentos, produtos naturais (com aplicações tecnológicas) e proteção costeira (formam costas e ilhas), além de atrair turistas de todo o mundo devido sua beleza (MUMBY et al., 2008; RIEGL et al., 2009; HALPERN et al., 2012; LEAL et al., 2013). Embora não esteja relacionado diretamente ao sustento da vida humana em diversos países ricos pelo mundo, o valor econômico recebido do turismo devido aos recifes de corais é enorme. Por exemplo, três regiões do sul da Flórida (Miami-Dade, Broward

e Palm Beach) obtêm cerca de 6 bilhões de dólares anualmente com o turismo e a pesca em regiões de recifes (ERFTEMEIJER et al., 2012). Além disso, há estimativas de valores por quilometro quadrado de recifes de corais que podem variar de US\$ 100.000 – 600.000, podendo chegar a 1 milhão de dólares, na Indonésia, onde tem-se uma maior biodiversidade (COSTANZA et al., 1997; UNEP, 2006; HICKS et al., 2009; STOECKL et al., 2011). Portanto, é preocupante a deterioração que vem ocorrendo nos recifes por todo o mundo, cerca de 30% dos recifes já estão danificados e outros 60% correm riscos de serem extintos até o ano de 2030 (UNEP, 2006).

Os corais vivem atualmente sobre grandes estresses que levam a sérios riscos a sua saúde, tais como poluição, mineração dos corais, assoreamento, tempestades tropicais, doenças associadas a corais, danos provocados pelo turismo, pesca predatória excessiva (para consumo e para o mercado de espécies marinhas ornamentas “EMO”), e impactos antrópicos aos recifes de corais. Estes eventos transformam ambientes de alta biodiversidade de organismos em ambientes dominados exclusivamente por algas, que conseqüentemente causam sérios danos a cadeia alimentar do ecossistema marinho (AINSWORTH et al., 2009; ROSENBERG et al., 2009). Uma alternativa de estudo que vem crescendo exponencialmente são os estudos sobre microbiologia de corais, que além de agregar valor econômico e estimular a preservação dos ambientes recifais, também vem fornecendo possíveis vias tecnológicas para salvar esse ecossistema.

## 1.2 Microbiologia em corais

Os microrganismos são componentes chave de todos seres vivos e ecossistemas, participando ativamente no metabolismo e no ciclo de nutrientes (AINSWORTH et al., 2009; GARREN & AZAM, 2012; THOMPSON et al., 2014). Essa coexistência permanente entre hospedeiro e sua microbiota (simbiogênese) forma o holobionte, uma unidade de seleção natural (MARGUILES, 1993).

No que diz respeito aos corais, o holobionte consiste do coral hospedeiro e toda sua microbiota associada, incluindo bactérias, vírus, fungos, arqueias e protistas (ROHWER et al., 2002; ROSENBERG et al., 2007a).

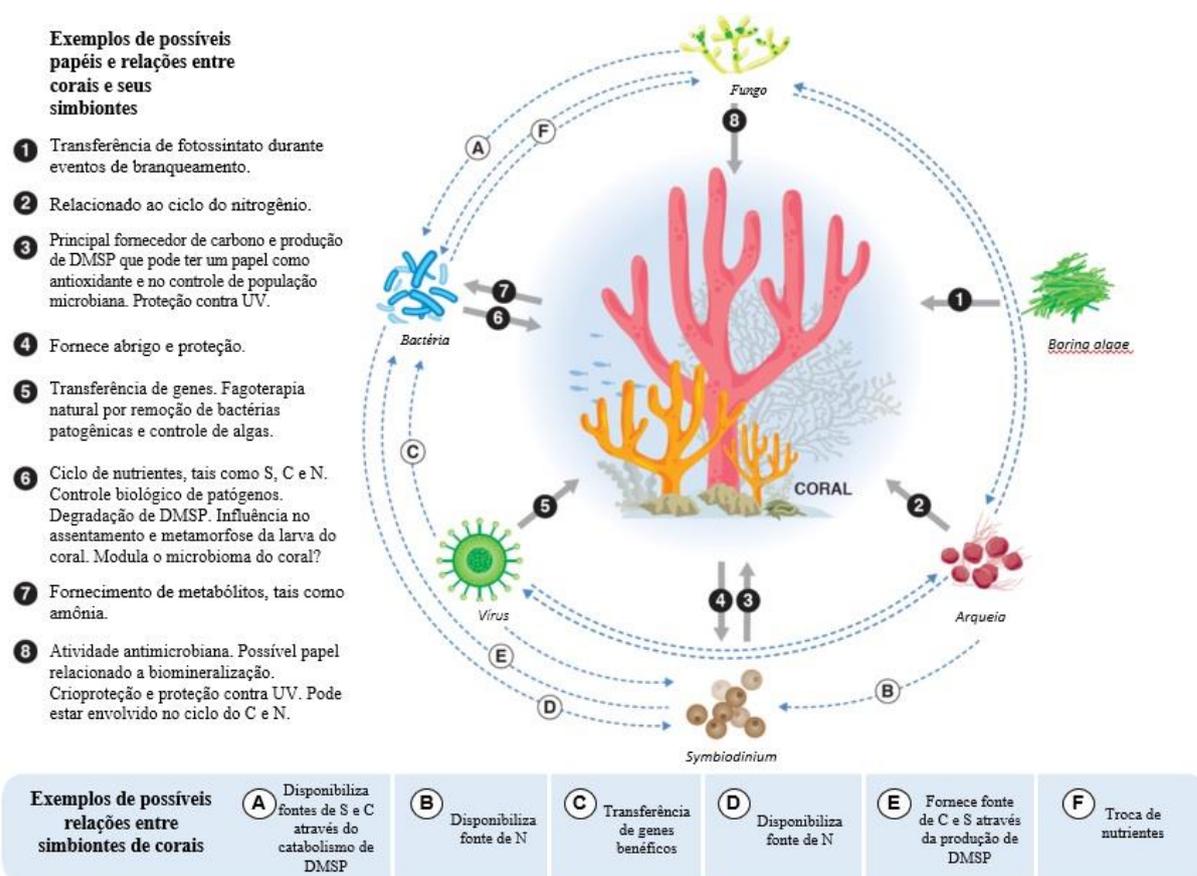
Nos últimos anos, diversos estudos têm documentado a importância da relação entre os corais e sua microbiota, focando principalmente nas respostas das comunidades microbianas associadas aos corais frente a mudanças nas condições de saúde do coral (HARVELL et al., 2007; BOURNE et al., 2008; JONES et al., 2008; GLASL et al., 2016; GUEST et al., 2016) e nos estresses naturais e antropogênicos (DONEY et al., 2012; VEGA THURBER et al., 2014; GARREN et al., 2015; KWIATKOWSKI et al., 2015). Mudanças nas condições ambientais podem modificar a fisiologia do coral, induzindo uma rápida troca na comunidade microbiana que, as vezes, leva ao surgimento de doenças (HARVELL et al., 2007; MOUCHKA et al., 2010).

Existem evidências de que os corais podem se tornar mais resistentes ao aumento de temperatura através da mudança de seus simbiontes fotossintéticos para clados mais termotolerantes (JONES et al., 2008), além de estudos reportando a importância do genoma do coral na sua resiliência (BHATTACHARYA et al., 2016). Similarmente, há relatos do desenvolvimento de resistência em alguns corais, que são seres dos quais não possuem um sistema imunológico adaptativo, contra certos patógenos (ROSENBERG et al., 2007b), e essa resistência seria providenciada pela microbiota associada ao coral, afirmação essa baseada na hipótese do coral probiótico (CPH) (RESHEF et al., 2006). Essa hipótese sugere que o microbioma do coral pode ser modulado para beneficiar a resiliência e a saúde dos corais.

Porém, ainda existem lacunas a serem preenchidas no nosso conhecimento sobre a atual relação e papel da microbiota associada ao coral durante eventos de branqueamento e doenças. Igualmente, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares relacionadas a essa proteção “probiótica” e o que realmente é necessário para serem considerados “probióticos”.

Seguindo esse pensamento, o termo “ Microrganismos benéficos para corais” (BMC) (PEIXOTO et al., submetido) tem sido proposto por nossa equipe de laboratório para esses microrganismos “probióticos” fazendo analogia ao termo “Rizobactérias Promotoras de Crescimento de Plantas” (Plant Growth Promoting Rhizobacteria, PGPR) (KLOEPPER AND SCHROTH, 1978), que são simbiontes bem descritos de plantas que possuem mecanismos que promovem o crescimento e o desenvolvimento

das plantas (LUGTENBERG & KAMILOVA, 2009; PODILE & KISHORE, 2007). BMC refere-se aos microrganismos envolvidos na manutenção e proteção do equilíbrio fisiológico do coral. Os mecanismos que tornam um determinado microrganismo em um potencial candidato a ser um BMC são definidos com base nas publicações recentes que exemplificam alguns papéis importantes que os microrganismos podem ter para promover a saúde nos corais. Essa rede de interações e possíveis papéis que envolve todas as partes de um coral holobionte está representado na figura 2. Importante notar que esses mecanismos e interações são alguns exemplos prováveis de mecanismos de BMC. Outros mecanismos devem existir, porém mais estudos são necessários.



**Figura 2:** Possíveis papéis e relações entre corais e seus grupos simbiotes. Extraído e modificado de PEIXOTO et al., submetido.

Existem discussões quanto a aplicabilidade do termo probiótico em corais devido a sua definição ser primeiramente relacionada exclusivamente à hospedeiros mamíferos (FULLER, 1989; VERSCHUERRE et al., 2000). Dentre diversas definições já propostas para o termo probiótico, atualmente a utilizada é providenciada pela Organização da Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO/WHO) (2001), cuja

definição é “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios ao hospedeiro”. Reshef e colaboradores (2006) quando propuseram o termo CPH (*coral probiotic hypothesis*) sugeriram que o termo probiótico fosse aplicado a invertebrados, tais como corais. O uso do termo probiótico descreve simplesmente microrganismos que podem providenciar benefícios nutricionais para o hospedeiro (pro – “a favor de” e bio – “vida”). Porém, é preciso considerar que os simbioses dos corais podem providenciar muitas vantagens que vão além dos benefícios nutricionais, incluindo controle biológico de patógenos.

Portanto, apesar dos diversos requerimentos necessários para classificação de produtos probióticos impostos pela Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP, 2014), nós estamos propondo o uso do termo BMC para tratar especificamente de simbioses de corais que possuem traços benéficos que atuam sobre a saúde e contribuem para a resiliência dos corais.

### 1.3 Microrganismos benéficos para corais (Beneficial Microorganisms for Corals, BMC)

Distintas comunidades microbianas podem colonizar diferentes estruturas nos corais, tais como a camada de mucopolissacarídeos, o tecido do coral, a cavidade gastrovascular e o esqueleto (ROSENBERG et al., 2007a; AGOSTINI et al., 2012; GLASL et al., 2016). Essa grande variedade de microbioma associada ao coral aumentam a gama de potenciais funções de BMC que estes microrganismos podem desempenhar no holobionte.

Esses microrganismos associados aos corais têm um importante papel na manutenção do balanço dinâmico do holobionte formando uma rede de conexões (figura 2), tais como atuando como mediadores no ciclo do nitrogênio e do enxofre, na captura de carbono e na produção de antimicrobianos, no qual está associada ao controle biológico de patógenos (AINSWORTH et al., 2009; KREDIET et al., 2013). Tendo conhecimento dos diferentes papéis que diferentes grupos microbianos desempenham dentro do holobionte, alguns mecanismos alvos específicos devem ser investigados para identificação de potenciais BMC. A tabela 1 resume algumas características que um BMC deve possuir.

**Tabela 1:** Exemplos de características propostas para BMC (Microrganismos Benéficos para Corais) e potenciais mecanismos. Extraído e modificado de PEIXOTO et al., submetido.

<b>Características benéficas propostas (BMC características)</b>	<b>Mecanismos benéficos</b>	<b>Referências descrevendo esses mecanismos</b>
Fotossíntese	Entrada de compostos orgânicos no holobionte	VERBRUGGEN & TRIBOLLET, 2011; BURRIESCI et al., 2012; DAVY et al., 2012; TREMBLAY et al., 2012
Fixação de nitrogênio	Entrada de nitrogênio fixado no holobionte	OLSON et al., 2009; LEMA et al., 2012; SANTOS et al., 2014; CARDINI et al., 2014; BEDNARZ et al., 2015
Produção de DMSP	Controle da população de bactérias na superfície do coral	BAROTT & ROHWER, 2012
Degradação de DMSP	Aumento da disponibilidade de carbono e enxofre	KIRKWOOD et al., 2010
Produção de catalase	Minimiza a concentração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	LESSER, 2012
Produção de sinais mediadores do assentamento larval	Contribui para modulação e regulação do assentamento larval	WEBSTER et al., 2004; HEYWARD & NEGRI, 2010; RITSON-WILLIAMS et al., 2010; DOBRETISOV et al., 2013; SHIKUMA et al., 2014
Produção de antibióticos e competição com patógenos	Controle biológico de patógenos	RITCHIE, 2006; GOCHFELD & AEBY, 2008; KIRKWOOD et al., 2010; KVENNEFORS et al., 2011; ALAGELY et al., 2011
Produção de moléculas sinalizadoras de <b>quorum sensing</b> (QS), tais como <i>N</i> -acil homoserina lactonas (AHLs)	Permitir interações microbianas dentro do holobionte; podendo atuar no controle da colonização bacteriana, na bioluminescência, no controle da patogênese e na produção de enzimas extracelulares	HENKE & BASSLER, 2004; NG & BASSLER, 2009; TAIT et al., 2010; SHARP & RITCHIE, 2012; CERTNER AND VOLLMER, 2015; MEYER et al., 2015
Mecanismos que influenciam a proteção de células esquelotogênicas	Aumentam a proteção e sobrevivência de células esquelotogênicas	DOMART-COULON et al., 2004
Produção de aminoácidos tipo micosporina (MAA)	Proteção do tecido do coral contra UV	DUNLAP & SHICK, 1998

#### 1.4 Doenças de corais

Nas últimas décadas, os recifes de corais por todo o mundo têm sofrido vasta deterioração devido à um conjunto de fatores, naturais e antropogênicos (HUGHES et al., 2003; HARVELL, 2004), que afetam sua resiliência (WILLIS et al., 2004). O dano ao coral pode ser causado por fatores abióticos (estresse por mudança de temperatura, sedimentação, radiação ultravioleta e etc) (BRUNO et al. 2003; HARVELL et al., 2007, BURGE et al., 2014) e por fatores bióticos (predação, crescimento excessivo de algas e doenças) (DAVY et al., 2006; BOURNE et al., 2009; KREDIET et al., 2013), que juntos ou separados geram grandes ameaças aos recifes (HUGHES et al., 2003).

Como mencionado acima, os corais vivem em um equilíbrio dinâmico com seus simbiontes microbianos, e a interrupção dessa homeostase pode resultar em mudanças fisiológicas que muitas vezes causam doenças ou até mesmo levam a morte do coral hospedeiro. Da mesma forma que muitos microrganismos estão intimamente relacionados a saúde do coral, muitas doenças já foram descritas associadas a um patógeno microbiano (PATTERSON et al., 2002; BEN-HAIM et al. 2003a; FRIAS-LOPEZ et al., 2004; ROSENBERG & FALKOVITZ, 2004).

A primeira doença descrita de coral foi reportada por Antonius nos anos 70 e o número de novas doenças sendo relatadas vem aumentando gradativamente (HARVELL, 2007). Existem, ao menos, 18 doenças já descritas (ROSENBERG et al., 2007b; BOURNE et al., 2009). Doenças emergentes foram responsáveis pela morte de 30% dos corais nos últimos 30 anos e predições mostram que até 2050 grande parte dos recifes de corais serão perdidos (RESHEF et al., 2006).

As pesquisas sobre doenças de corais têm mudado substancialmente, de uma descrição geral e simples dos sinais das doenças observadas em campo (RUTZLER & SANTAVY, 1983), para estudos microbianos baseados em métodos de cultura e metagenômica (KVENNEFORS et al., 2010), além da presença de biofilmes microbianos, coloração anormal e anormalidades no esqueleto (BOURNE et al, 2009; KREDIET et al, 2013).

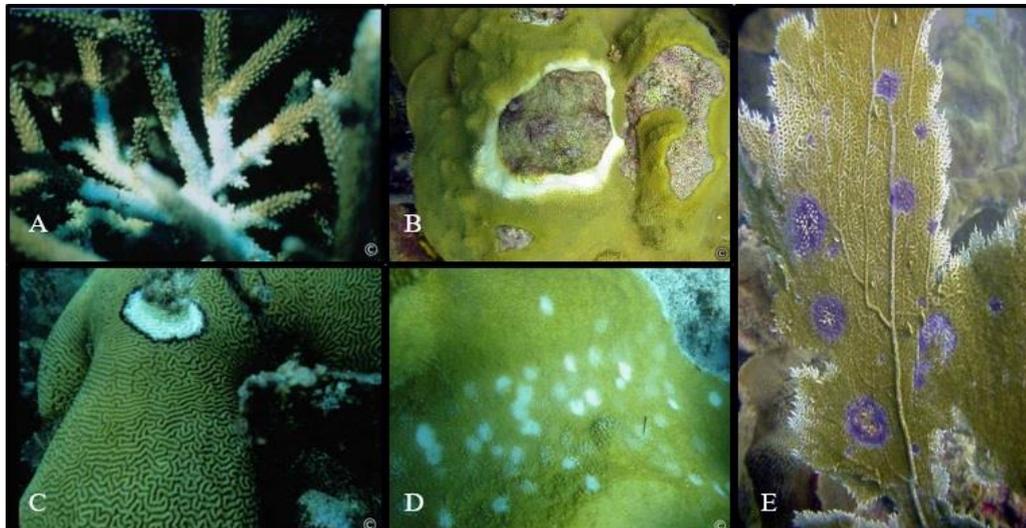
Algumas doenças (figura 3), tais como “*White Band II*” causada pelo patógeno *Aurantimonas coralicida* (DENNER et al., 2003), “*White Pox*” causada pelo patógeno *Serratia marcescens* (SUTHERLAND & RITCHIE, 2004), aspergilose causado pelo patógeno *Aspergillus sydowii* (KIRKWOOD et al., 2010) e “*White Plague II*” (DENNER et al., 2003) parecem estar associadas a patógenos bacterianos únicos e conhecidos, identificados através do postulado de Koch (SUSSMAN et al., 2008), enquanto outras doenças parecem ser causadas por um consórcio de microrganismos, como por exemplo, a “*Black Band Disease*” (BBD) (SATO et al., 2013). Porém, a identificação por postulado de Koch vem gerando controversas (KREDIET et al., 2013), devido ao fato de alguns corais não serem mais susceptíveis à agentes que causavam doenças no passado (RESHEF et al., 2006; AINSWORTH et al., 2008; SUTHERLAND et al., 2011). Além disso, existem hipóteses alternativas sobre as causas de doenças de corais, que sugerem que estas não são causadas por patógenos específicos e sim por um conjunto de sintomas que podem ser provocados por patógenos oportunistas que atacam o hospedeiro quando esse está debilitado (LESSER et al., 2007). Corroborando essa hipótese, corais tratados com 5 mgL<sup>-1</sup> a 25 mgL<sup>-1</sup> de carbono orgânico sofreram branqueamento e necrose do tecido (KUNTZ et al., 2005), provavelmente por alterar a composição da microbiota associada ao coral e/ou por aumentar a taxa de crescimento de patógenos oportunistas presentes na superfície do coral (TEPLITSKI & RITCHIE, 2009).

A presença de microbiota indígena pode dificultar o diagnóstico de doenças de corais, devido ao fato de que alguns autores enfatizam a importância do desenvolvimento de estudos que caracterizem a microbiota "saudável" para apoiar outros estudos subsequentes visando isolar os microrganismos patogênicos ou oportunistas (LESSER et al., 2007). Ainda assim, é comum a dificuldade em achar e verificar uma correlação entre a diversidade taxonômica dos microrganismos e a ocorrência da doença (LESSER & JARETT, 2014). Dado que a identificação taxonômica de um microrganismo não elucidada seu papel funcional, alguns estudos, como o do Pratte (2013), têm se concentrado na caracterização de genes microbianos funcionais em corais saudáveis. Importante lembrar que a comunidade microbiana do coral pode ser dinâmica, variando de acordo com fatores abióticos não relacionados às doenças. Portanto, é difícil determinar a microbiota "saudável" quando são baseadas em descrições momentâneas dessas comunidades, por conta disso,

pesquisas temporais – sazonais são necessárias para melhor elucidação dessa questão.

Historicamente, o foco das pesquisas de doenças de corais tem se baseado em estudos que relacionam essas doenças a infecções bacterianas ou fúngicas (SWEET et al., 2011a). Atualmente há relatos de doença em *Porites* sp. onde o agente etiológico é um trematoda (PALMER et al., 2009) e diversas doenças de recifes do Indo-Pacífico e do Caribe causadas por ciliados (PAGE & WILLIS, 2008; QIU et al., 2010).

Grande parte dos surtos de doenças são precedidos de branqueamento, que ocorre quando o coral expõe seus dinoflagelados endossimbiontes, e caso o coral não recupere seus endossimbiontes, eles morrem em poucas semanas (CAUSEY, 2008; BRANDT & MCMANUS, 2009; PANDOLFI, 2015). O branqueamento difere-se da doença no qual está associado a perda inicial de tecido (ROGERS & MILLER, 2013).



**Figura 3:** Doenças de coral. (A) “White Band II” em *Acropora cervicornis*; (B) “Yellow Band” em *Montastraea faveolata*; (C) BBD em *Diploria labyrinthiformis*; (D) “White Pox” em *Acropora palmata*; (E) Aspergilose em *Gorgonia ventalina*.

### 1.5 Aquarismo e sua importância

Além de sua importância ambiental, incluindo o papel ecológico e econômico dos recifes de corais, os corais possuem ainda uma grande importância para a prática

do aquarismo. O aquarismo é um hábito comum no mundo inteiro, sendo a criação de peixes a terceira mais praticada no mundo, atrás apenas das de cachorros e gatos. Até 2003, cerca de 2 milhões de pessoas no mundo mantinham aquários marinho em suas residências (WABNITZ et al., 2003), e esse número quase dobra, para 3.5 milhões, até o ano de 2010 (DEY, 2010).

Aquários marinhos mantidos em casa ou aquários públicos abertos a visitas podem ajudar a educar e a informar ao público sobre a conservação e a grande biodiversidade dos recifes (WOOD, 2001). Além disso, o uso de aquários é citado como uma solução para reduzir as pressões sobre os recifes de corais, no que diz respeito a captura de peixes e coleta de corais direto de seus ambientes selvagens (MOORHEAD & ZENG, 2010; OLIVOTTO et al., 2011; MURRAY et al., 2013) devido a criação das EMO em cativeiro, que tem como objetivo a venda para o mercado do aquarismo. Essa prática tem evitado a retirada de peixes e corais de seus ambientes naturais, além de ajudar na criação de espécies comuns e, principalmente, espécies raras que se saem melhor em cativeiro (OGAWA & BROWN, 2001; OLIVER, 2003).

#### 1.6 Indústria do aquarismo: aquacultura

A aquacultura é a produção de organismos aquáticos, tais como peixes, crustáceos, anfíbios, répteis, moluscos e plantas para o consumo humano ou para serem mantidos em cativeiro (ornamental). A aquacultura ornamental marinha providencia diversas oportunidades de emprego para as áreas rurais (KUMAR et al., 2015) de mais de 45 países, tais como: Singapura, Malásia e Indonésia como os principais no mercado da aquacultura ornamental mundial, seguidos por Brasil, Maldivas, Vietnã, Sri Lanka e Havaí (WOOD, 2001; DEY, 2010). Devido ao alto valor das EMO, a sua criação pode fornecer apoio à subsistência dos países em desenvolvimento (BAZILCHUK, 2008). Estima-se que o mercado internacional de peixes e corais ornamentais movimenta mais de 8 bilhões de dólares por ano, enquanto toda a indústria do ramo do aquarismo no qual inclui ainda aquários, acessórios, rações, plantas ornamentais e medicamentos alcance a marca de mais de 20 bilhões de dólares anuais (KUMAR et al., 2015).

Existem poucos estudos relacionados a variedade de espécies de corais que são comercializadas (figura 4), mas há uma década acreditava-se que esse número alcançasse 140 espécies e que mais de 10 milhões de “peças” eram retiradas todo ano dos recifes (WABNITZ et al., 2003; VINCENT, 2006). No ano de 2010, apenas os Estados Unidos importaram mais de meio milhão de “peças” de corais (RHYNE et al., 2012). Esta vida selvagem é recolhida com a finalidade de estocar habitat aquáticos artificiais em casas e instituições públicas (aquários, museus e jardins zoológicos) (RHYNE et al., 2014). Todavia, esse mercado tem trazido alguns benefícios, tais como incentivando pessoas a se preocupar com essas regiões mais remotas que possuem como principal renda o mercado de espécie marinhas, dessa forma aumenta o interesse por pesquisas básicas e educação, além de encorajar crianças a praticar princípios científicos e escolher a ciência como carreira (RHYNE et al., 2012; TLUSTY et al., 2013).

Os corais estão entre as espécies mais exploradas dentro do mercado marinho ornamental (RHYNE et al., 2009), conseqüentemente, algumas alternativas para minimizar os impactos que os recifes sofrem com a retirada desses animais é através do desenvolvimento de técnicas de culturas simples de corais em aquacultura *ex situ* (em aquário) e *in situ* (no mar) (OSINGA et al., 2012). Essas práticas contribuem ainda para projetos de reconstrução de recifes (BOWDEN-KERBY, 2001).

No Brasil, segundo dados do SEBRAE, o aquarismo é essencial para a economia do país, gerando 25 mil empregos diretos e 75 mil empregos indiretos que envolvem desde os pescadores até os importadores, exportadores e distribuidores. Cerca de 120 espécies de peixes de recifes brasileiros fazem parte do mercado bilionário do aquarismo no mundo. Dentre as 75 espécies mais exploradas, 26 (34,7%) são endêmicas, oito (10,7%) são consideradas raras, e seis (8,2%) são espécies dependentes de estuarinas (GASPARINI et al., 2005).



**Figura 4:** Corais coletados para o comércio.

Fonte: <https://www.reefs.com/blog/2016/02/16/indonesian-coral-collection-rules-abuse/>

O hábito de praticar aquarismo sofreu grandes mudanças nos últimos 60 anos (WOOD, 2001; RHYNE *et al.*, 2009; MURRAY *et al.*, 2012). Mudanças na tecnologia, principalmente em relação a iluminação com lâmpadas LED e T5 (JOSHI, 2010) e filtragens (ADAMS, 2010), fizeram com que os aquaristas passassem a manter pequenos ecossistemas vivos em cativeiro como mini aquários de recife (figura 5), ao invés de aquários com apenas peixes ornamentais (RHYNE & TLUSTY, 2011; MURRAY & WATSON, 2014). Enquanto mudanças na economia mundial afetaram as habilidades dos consumidores de adquirir espécies de todo o mundo, por exemplo, as rotas de grandes companhias aéreas internacionais controlam o transporte de peixes e corais de atóis remotos para grandes mercados do aquarismo, como Estados Unidos e Europa (TEITELBAUM *et al.*, 2010).

O mercado de EMO também pode ser um problema quando feito de forma errônea, principalmente no que diz respeito à coleta excessiva de peixes e corais de ambientes silvestres, assim como pela forma como a coleta é realizada, muitas vezes com uso de cianeto (SHUMAN *et al.*, 2005; TISSOT *et al.*, 2010), químico utilizado para deixar os peixes mais calmos e lentos, facilitando a sua captura (RANDALL, 1987). Além disso, a liberação de espécies não nativas da região também pode levar à sérios riscos ao ambiente e equilíbrio do ecossistema dos recifes (SIMBERLOFF, 2011; STRAYER, 2012).



**Figura 5:** Mini aquário de recife. Fotografado por Jake Adams. Extraído de RHYNE & TLUSTY, 2011.

### 1.7 Aquariologia como ferramenta científica

Não apenas um hábito que vem crescendo a cada ano, o aquarismo também é utilizado como uma ferramenta científica. Seguindo o progresso da evolução do conhecimento científico surgiu a aquariologia, que é o estudo de ecossistemas aquáticos utilizando-se aquários de água doce e salgada (GRATZEK & MATTHEWS, 1994). Nos dias atuais, a aquariologia vem desenvolvendo importantes pesquisas e alcançando resultados excelentes quanto à reprodução perfeita dos ecossistemas aquáticos, conseguindo instrumentos capazes de simular suas condições físicas, químicas e biológicas. Tais esforços se justificam de repovoamento de espécies raras e/ou sensíveis (OGAWA & BROWN, 2001; OLIVER, 2003), além da necessidade de conhecer mais de perto os ecossistemas não perturbados bem como os perturbados, para distinguir os vetores e suas sequelas causadas ao meio ambiente. O suporte técnico criado pelos cientistas gera sistemas no aquarismo que aproximam o “*hobby*” da ciência, tornando o aquarismo avançado uma ciência de fato.

### 1.8 Doenças de corais em aquários

Uma das maiores dificuldades de se manter a simulação de um recife de coral em aquários é a perda do coral devido a doenças, normalmente provocadas por algum desequilíbrio no ecossistema do aquário ou em mudanças nos parâmetros da água.

Essas doenças em corais têm sido cada vez mais relatadas ao longo das últimas décadas (SWEET et al., 2011a). O site [aquariumcoraldiseases.weebly.com](http://aquariumcoraldiseases.weebly.com), muito conhecido entre os aquaristas, descreve algumas das principais doenças reportadas em corais ornamentais, dentre elas, doenças muito bem descritas em corais de recifes naturais, tais como “*White Syndrome*” (WS) e BBD.

Embora existam poucos trabalhos relatados na literatura científica sobre as doenças de coral em aquários, uma grande quantidade de material está disponível na internet. Estas informações sem valor científico podem ser usadas para ajudar no conhecimento atual das doenças mais comuns que ocorrem dentro de aquários (SWEET et al., 2011a).

### 1.9 *Pocillopora damicornis*

*Pocillopora damicornis* (LINNAEUS, 1758) (figura 6) é um dos principais corais escleractíneos formadores de recifes no mundo (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2004). Essa espécie de coral possui uma ampla distribuição geográfica que se estende por todo Oceano Pacífico-Índico, Golfo Pérsico, Mar Vermelho e litoral oeste da América Central (HOEKSEMA et al., 2014).

Essa espécie de coral é comumente encontrada em uma vasta variação de profundidades, de 1 a 20 metros, além de ser mais comum em habitats próximos à mangues e pilares de sustentação de cais (HOEKSEMA et al., 2014). É um coral hermafrodita com cores que variam do marrom escuro ao rosa esverdeado. Em ambientes com recifes rasos ou em mar profundo com águas mais calmas os ramos das colônias se tornam mais finos e amplamente espaçados, porém em ambientes que possuam muita ação de ondas e águas mais movimentadas os ramos se tornam mais grossos e compactos (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2004). *P. damicornis* pertence ao filo Cnidária, classe Anthozoa, ordem Scleractinia, família Pocilloporidae e gênero Pocillopora.



**Figura 6:** Colônia de *Pocillopora damicornis*. Foto concedida por Leonardo Carvalho.

Uma das principais ameaças a esse coral, além das mais conhecidas como mudanças climáticas de temperatura, acidificação dos oceanos, pesca predatória e poluição, é a grande quantidade de coral que é removido dos recifes para serem utilizados como material de construção, na fabricação de cal, e para serem vendidos no mercado de aquarismo. Essa espécie é muito utilizada no ramo do aquarismo, apenas a Indonésia é responsável por fornecer cerca de 6 mil peças de *P. damicornis* anualmente (HOEKSEMA et al., 2014).

#### 1.10 *Vibrio coralliilyticus*

*Vibrio coralliilyticus* é uma espécie de bactéria gram-negativa, que possui motilidade e formato de bastonete (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2004).

Essa bactéria está associada à infecção de uma ampla quantidade de organismos, tais como algas unicelulares (DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2011), ostras (JEFFRIES, 1982), camarões (AUSTIN et al., 2005; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2011), trutas (AUSTIN et al., 2005) e moscas (ALVES et al., 2010; DE OLIVEIRA SANTOS et al., 2011), além do fato de recentemente serem utilizados como

patógenos modelos nos estudos relacionados ao mecanismo de ligação entre bactéria e doenças de corais (POLLOCK et al. 2010; KIMES et al. 2011; GARREN et al. 2014).

A espécie *V. coralliilyticus* tem sido associada a doenças relacionadas com a perda de tecido do coral, como a WS em alguns recifes do Indo-Pacífico (SUSSMAN et al. 2008; USHIJIMA et al. 2014). Essa perda de tecido é consequência da alta atividade proteolítica dessa bactéria, que produz uma metaloproteinase envolvida no processo de clivagem do tecido, além de outras perturbações celulares (COHEN et al., 2013). Foi primeira vez isolada de corais *P. damicornis* que apresentavam sinais de branqueamento e doença na costa de Zanzibar na Tanzânia (BEN-HAIM et al. 2003a,b). Essa primeira estirpe isolada, a *V. coralliilyticus* ATCC (*American Type Culture Collection*, Manassas, EUA) BAA-450, foi descrita por possuir uma virulência dependente de temperatura, na qual em temperaturas acima de 27°C é capaz de invadir e lisar o tecido do coral *P.damicornis*, entre 24°C e 26,5°C ataca a alga simbiótica do coral, levando ao branqueamento e abaixo de 24°C é considerada avirulenta (BEN-HAIM et al., 2003b).

#### 1.11 Possíveis tratamentos

Uso de antibióticos, remoção do tapete microbiano associado à lesão, sombreamento da área infectada, fagoterapia, aplicação de argila sobre o tecido infectado, controle biológico e uso de probióticos são tratamentos conhecidos que já tiveram algum sucesso, pelo menos em parte, no combate às doenças de corais em ambientes naturais e em aquários.

O tratamento de doenças de corais com antibióticos em um sistema aberto, tal como recifes de corais, não é prático (EFRONY et al., 2007) pelo fato de possuir altos custos, ser prejudicial às bactérias simbióticas associadas ao coral e de possivelmente selecionar estirpes resistentes (TEPLITSKI & RITCHIE, 2009; SWEET et al., 2011a). Porém, em aquários, é o tratamento mais comum no controle de doenças, através do uso de cloranfenicol, doxiciclina e oxitetraciclina (SWEET et al., 2011a).

A primeira tentativa de tratamento de doença de coral em ambientes naturais ocorreu na Florida nos anos 80, através do uso de um aspirador subaquático para

retirar o tapete polimicrobiano que causava a BBD nos corais (Figura 7) da “*Looe Key National Marine Sanctuary*” (HUDSON, 2000) que obteve baixa taxa de reinfecção (30%) dos corais tratados. Embora seja um tratamento razoavelmente eficaz de uma colônia de coral por vez, esse tipo de abordagem necessita de um grande investimento de trabalho e demonstra a necessidade de novas abordagens viáveis para o tratamento de doenças de coral.



**Figura 7:** Tratamento do coral com BBD através da remoção do tapete microbiano com auxílio de um aspirador subaquático. (M) Tapete polimicrobiano que causa BBD; (N) Esqueleto exposto do coral morto.

Algumas doenças, tais como “*Yellow Band Disease*” (YBD) e “*White Plague*” já foram reportadas por serem tratadas em campo, envolvendo a aplicação de argila sobre o tecido infectado (MILLER et al., 2003). Outra alternativa bem-sucedida foi através do uso de técnicas de restauração biológicas em recifes, recrutando corais e reduzindo sua mortalidade. Isso ocorreu pela reintrodução do ouriço do mar *Diadema antillarum*, também na Florida, como ferramenta para reduzir a população de macroalgas e assim, aumentar o assentamento das larvas de coral no sedimento.

A descoberta de fagos (vírus de bactérias) para o controle de bactérias patogênicas de coral (EFRONY et al., 2007) e o uso de agentes biocontroladores, ou seja, bactérias simbióticas de coral (SHNIT-ORLAND & KUSHMARO, 2009; KREDIET et al., 2013) são potenciais ferramentas para o controle de doenças causadas por patógenos primários ou oportunistas.

Os fagos são específicos, ou seja, eles infectam apenas bactérias patogênicas específicas, logo, não afetaria a comunidade microbiana residente do coral (ATAD et al., 2012; COHEN et al., 2013). Além disso, é uma ferramenta mais promissora do que o uso de antibióticos, já que os fagos se multiplicam apenas enquanto seu hospedeiro ainda estiver presente (JENSEN et al., 2006), logo, uma única administração do fago seria requerida por tratamento e isso faz da fagoterapia uma ferramenta útil na tentativa de controle de doenças de corais. Porém, assim como em tratamentos com antibióticos, a fagoterapia também é capaz de selecionar estirpes resistentes (TEPLITSKI & RITCHIE, 2009).

Experimentos em aquários demonstraram que a aplicação de  $10^3 \text{ ml}^{-1}$  de fagos da *Vibrio coralliilyticus* foram capazes de proteger o coral *Pocillopora damicornis* por 2 meses. Além disso, uma reinfecção com o patógeno nos corais tratados com a fagoterapia não levou ao surgimento de sinais de doenças (EFRONY et al., 2007). Em outro estudo, o uso de fagos específicos para a *Vibrio coralliilyticus* P1, foi capaz de reduzir significativamente a inibição do fotossistema II das zooxantelas causada pela liberação de metaloproteinase dependente de zinco pelo patógeno. A adição dos fagos causou lise das bactérias e, presumidamente, a taxa de metaloproteinase no meio foi reduzida (COHEN et al., 2013).

Além da fagoterapia, as interações entre bactérias simbióticas e patógenos de corais também são estudadas para entender a ocorrência das doenças. Essas bactérias são capazes de produzir compostos antimicrobianos, inibir enzimas catabólicas do patógeno, interromper a comunicação célula-célula entre os patógenos e consequentemente excluí-los da superfície do hospedeiro (SHNIT-ORLAND & KUSHMARO, 2009; TEPLITSKI & RITCHIE, 2009; ALAGELY et al., 2011). Esse potencial de competição dessas bactérias e posteriormente exclusão do patógeno lhes confere o nome de probiótico.

Alguns poucos estudos já identificaram bactérias com potencial antagonista contra um amplo número de patógenos (THOMPSON et al., 2014), incluindo *V. coralliilyticus*, que teve o crescimento inibido por bactérias relacionadas a alphaproteobacteria, gammaproteobacteria, bacilos, *Pseudoalteromonas* sp., e *Pseudovibrio* sp. (RYPIEN et al., 2010; VIZCAINO et al., 2010; KVENNEFORS et al.,

2011) e *Vibrio shiloi* por alguns membros de alphaproteobacteria e gammaproteobacteria (RYPIEN et al., 2010). Entretanto, estudos complementares que abordem esse tipo de interação antagonista entre bactérias nativas dos corais contra patógenos já bem descritos na literatura são necessários. Muitas dúvidas em relação as interações microbianas na superfície do coral que podem modular o aparecimento de doenças permanecem sem respostas. Não se sabe, por exemplo, a extensão da eficiência e a especificidade desse uso na proteção de corais em aquários e em campo, bem como não se conhece os mecanismos moleculares pelos quais o microbioma de coral consegue suporta a saúde dos corais e aumentar a resiliência após o surgimento de doenças.

Atualmente, não há no mercado do aquarismo um produto que atenda a essas especificações de um probiótico. O mais próximo de um probiótico é fornecido pela empresa “Prodibio” (<http://www.prodibio.com/>), que oferece diversos produtos relacionados a qualidade da água dos aquários, o que de fato, está estritamente ligado à saúde dos corais. Entretanto, não existe um produto relacionado diretamente ao controle de doenças de corais e a falta de produtos com esses fins, acaba fazendo com que sejam necessários mais estudos com essa abordagem.

O uso de uma estrutura tecnologicamente avançada, como um micro ou um mesocosmo, para experimentos que envolvam, não somente interações entre bactérias, mas também que mimetizem mudanças ambientais, é de grande ajuda e permite a observação e a medição de respostas fisiológicas, biológicas e ecológicas dos corais e de sua microbiota (DUARTE et al., 2015), e, por oferecer condições bem próximas as encontradas na natureza, possibilita a obtenção de resultados mais precisos, realistas e confiáveis, permitindo o monitoramento de todo o processo de proteção, antes durante e após o processo de doença se estabelecer.

## 2. JUSTIFICATIVA

A proposta desse trabalho está relacionada à criação e validação do uso de microrganismos benéficos para corais (BMC) na proteção e recuperação de corais impactados ou em situação de estresse, seja por temperatura ou pela presença de patógenos. Além disso, envolve também a estreita relação entre aquários marinhos e os recifes de coral.

As crescentes ameaças aos corais têm gerado cada vez mais relatos de branqueamentos que, por consequência, enfraquece o holobionte e facilita a proliferação de patógenos oportunistas. Por esse motivo, o número de doenças e as predições de mortalidade dos recifes vem aumentando consideravelmente. É possível que em 30 anos haja mais de 30% de perda na cobertura dos recifes de corais pelo mundo (WILKINSON, 2002).

A ausência de estratégias de defesa para evitar essa perda imensurável dos recifes de corais é um dos principais temas discutidos entre cientistas por todo mundo. A necessidade de implementação de uma tecnologia capaz de beneficiar os corais é considerada primordial para que tenhamos alguma chance de ainda ver esse ecossistema no futuro próximo. Além disso, os corais também possuem importância para a prática do aquarismo, um "*hobby*" que vem crescendo exponencialmente.

Dentro deste contexto, este trabalho se propõe a gerar um novo tipo de abordagem, através do uso de BMCs, para ajudar a minimizar os danos causados aos corais frente aos possíveis desequilíbrios que podem ocorrer tanto em ambientes naturais quanto em aquários.

Os dados gerados nesse trabalho poderão proporcionar a criação de uma tecnologia inédita e ainda muito pouco estudada que é a manipulação de microrganismos de corais. Isso se trata da geração de um produto altamente patenteável, que pode ser utilizado a nível nacional e internacional e ainda, no futuro, ajudar a gerar dados para serem utilizados na elucidação dos mecanismos moleculares e as bases ecológicas da interação de corais com seus próprios microrganismos benéficos.

### 3. OBJETIVO

O objetivo geral desse projeto foi selecionar microrganismos benéficos do coral *Pocillopora damicornis* e montar um consórcio que seja capaz de aumentar a resistência do coral frente a estresse de temperatura e presença do patógeno *Vibrio coralliilyticus*.

#### 3.1 Etapas

- Isolar microrganismos benéficos do coral *Pocillopora damicornis*, testando a capacidade dos microrganismos isolados de apresentar antagonismo contra o patógeno *Vibrio coralliilyticus* YB (DSM19607), de apresentarem atividade de catalase e de apresentarem genes relacionados a fixação de nitrogênio, desnitrificação e degradação de dimetilsulfoniopropionato (DMSP).
- Identificar os microrganismos selecionados através do sequenciamento de DNA e montar um consórcio de BMC.
- Testar o consórcio de BMC em aquários com os corais em diferentes situações: i, aquários com corais sem nenhuma interferência extra; ii, aquários com corais e a inclusão do patógeno *Vibrio coralliilyticus* YB; iii, aquários com corais e a inclusão do consórcio de BMC selecionado neste estudo; iv, aquários com corais, inclusão do patógeno *Vibrio coralliilyticus* YB e inclusão do consórcio de BMC selecionado. Todas situações foram avaliadas em duas temperaturas diferentes, 25°C e 30°C.
- Validar os benefícios da aplicação do consórcio através da avaliação da saúde dos corais por quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas associadas ao coral e por observação morfológica do coral nos diferentes tratamentos.

## 4. METODOLOGIA

Um fluxograma (figura 8) foi desenhado para melhor visualização de todas as etapas da metodologia.

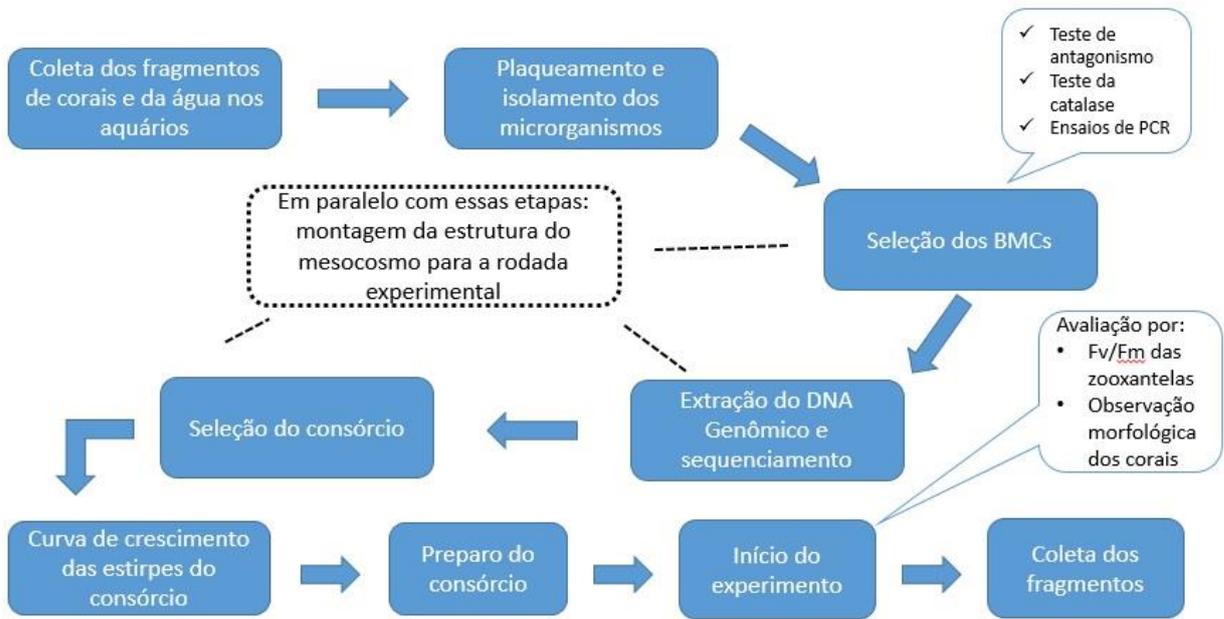
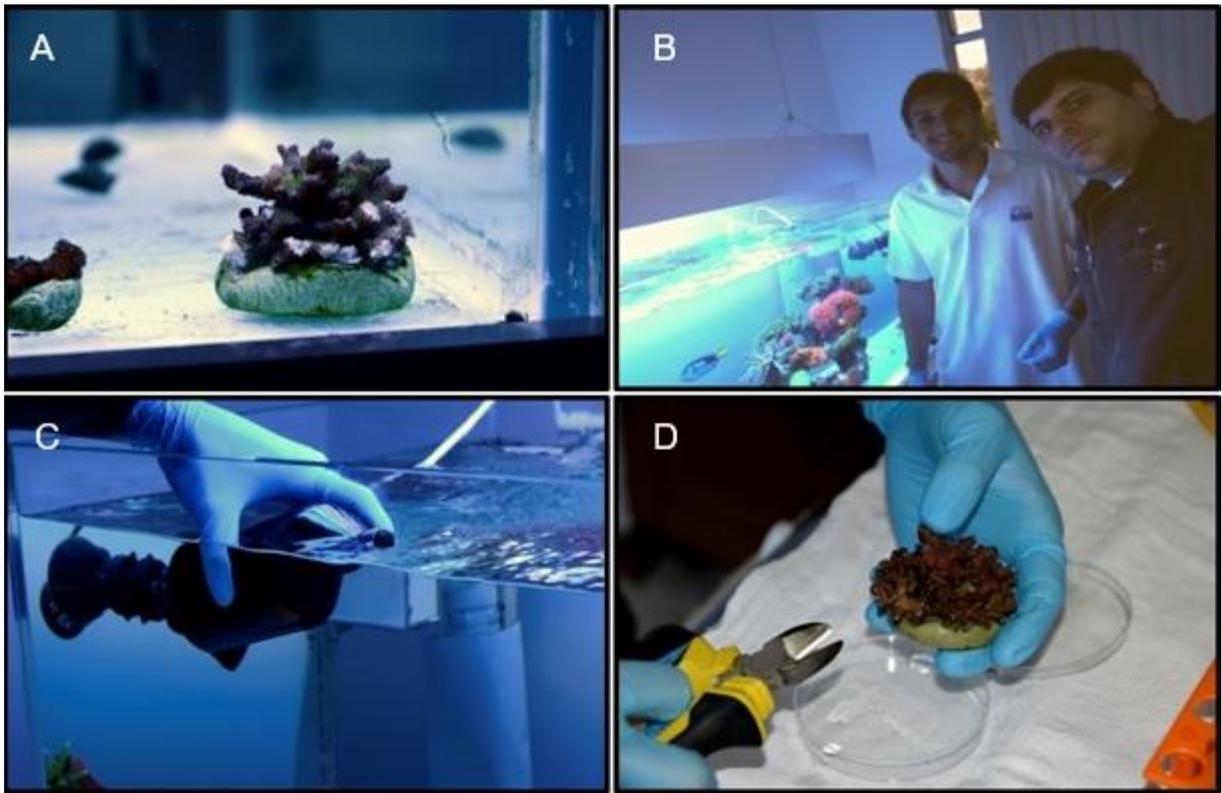


Figura 8: Fluxograma das atividades realizadas na metodologia.

### 4.1 Coleta dos fragmentos do coral *Pocillopora damicornis* e da água circundante

Foram adquiridos fragmentos de 1,5 a 2,0 cm de comprimento de duas amostras diferentes do coral *P. damicornis* e 500 ml da água dos aquários nos quais os corais estavam, ambas gentilmente foram doadas por aquaristas que cultivam esse coral no Brasil. A primeira amostra foi doada por Leonardo Carvalho e a coleta do coral foi realizada em sua residência em Nova Friburgo, Rio de Janeiro (Figura 9). A segunda amostra foi doada por Igor Albergaria do município de Peruíbe, São Paulo. Ele é membro da empresa Coral Vício ([www.coralvicio.com](http://www.coralvicio.com)) que trabalha no ramo do aquarismo.



**Figura 9:** Coleta do coral *Pocillopora damicornis* e da água circundante em Nova Friburgo – RJ. A, muda de *P. damicornis*. B, foto com Leonardo Carvalho. C, coleta de água do aquário com a garrafa de vidro. D, início da fragmentação do coral com auxílio do alicate de corte.

Para a obtenção dos fragmentos foi seguido um rigoroso protocolo para evitar contaminação por microrganismos exógenos ao aquário. Na coleta foram utilizados materiais estéreis tais como tubos falcon, luvas nitrílicas, placas de Petri, alicate de corte, pinças e garrafa de vidro. As amostras de fragmentos de corais estocadas em falcon e água estocadas em garrafas de vidro foram acondicionadas em isopor e levadas para o laboratório para serem processadas (Figura 10).



**Figura 10:** Materiais utilizados para coleta dos fragmentos de coral. A, álcool 70%, alicate de corte, pinça, isqueiro, garrafa de vidro e tubos falcon. B, fragmentos de *P. damicornis* estocados em tubo falcon. C, materiais estocados em isopor utilizado para transporte. D, início da fragmentação do coral com auxílio do alicate de corte.

Os fragmentos de ambos os corais e a água dos aquários foram utilizados para o isolamento de BMCs. Parte dos fragmentos de ambos os corais foram mantidos congelados para a correta identificação e confirmação da espécie *P. damicornis* via chave dicotômica. O processamento de todo material foi realizado no Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM).

#### 4.2 Plaqueamento e isolamento dos microrganismos

Ao chegar no laboratório, as amostras dos corais foram maceradas com auxílio de pistilo e cadinho de porcelana previamente esterilizados. O conteúdo de 1 grama do macerado de coral foi colocado em tubo falcon estéril de 50 ml contendo 9 ml de salina estéril (0.85% g/v de NaCl) e homogeneizado sob agitação de 120 rpm, a 28°C, por 16 horas. Após esta etapa foram realizadas diluições seriadas de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  desse homogeneizado em microtubos (Eppendorf) estéreis de 1,5 ml dentro do fluxo laminar e utilizados 0.1 ml de cada diluição para o plaqueamento em triplicata nos

meios de cultura LB (Luria Bertani Broth: Triptona – 10g; Extrato de levedura – 10g; Cloreto de sódio – 5g; Água destilada – 1000 ml) (SCHLEIF & WENSINK, 1981) e MA (Marine Agar Zobell 2216 - HIMEDIA) com diferentes salinidades de 3%, 8% e 15% de NaCl. As placas foram incubadas a 28°C por 16 horas.

Para o plaqueamento dos microrganismos da água dos aquários, 200 µl da água foram adicionadas diretamente às placas de Petri com meio de cultura dentro do fluxo laminar. Também foram utilizados nessa etapa os dois diferentes meios de culturas nas três salinidades mencionadas acima. As colônias morfologicamente distintas foram selecionadas e isoladas pela técnica de esgotamento em meio de cultura MA com 3% de salinidade.

#### 4.3 Estocagem dos isolados

Após o isolamento dos microrganismos, as colônias puras foram crescidas em tubos de ensaio de 15 ml contendo 5 ml de meio de cultura MA 3% por 16 horas. Posteriormente, 800 µl da amostra foi adicionada à criotubos de 1,5 ml contendo 200 µl de glicerol 80%. Por fim, as amostras foram agitadas em vórtex e mantidas a -80°C para posteriormente serem utilizadas nos testes de substâncias antimicrobianas (teste de antagonismo) contra o patógeno supracitado, de catalase e o de presença de genes relacionados a fixação de nitrogênio, desnitrificação e degradação de dimetilsulfoniopropionato (DMSP).

#### 4.4 Seleção dos microrganismos benéficos para corais

##### 4.4.1 Presença de substâncias antimicrobianas (teste de antagonismo)

A seleção dos BMCs antagonistas ao patógeno modelo foi avaliada através de dois diferentes testes de antagonismo. Um através da produção de substâncias antimicrobianas pelo método de difusão em ágar descrita previamente por Giambiagi-deMarval e colaboradores (1990), com modificações. Brevemente, 20 µl de cada microrganismo isolado foi inoculado em “spot” na placa de Petri contendo meio MA 3%. Foram 6 “spots” por placa de Petri, cada “spot” representando um isolado diferente. As placas foram incubadas a 28°C por 16 horas. Após o crescimento, as

placas foram levadas ao fluxo laminar onde foram invertidas sobre papel alumínio estéril e adicionado 1ml de clorofórmio embebido em algodão à superfície interna de cada placa por 30 minutos. O potencial antagonista foi determinado utilizando a estirpe indicadora *V. coralliilyticus* YB (DSM19607) que inicialmente foi cultivada em meio líquido MB (Marine Broth) 3% e posteriormente, inoculada (1µl/ml) em meio semi-sólido MA 3% para ser vertida sobre a superfície das placas que continham as colônias previamente inativadas com clorofórmio. As placas foram novamente incubadas a 28°C por 16 horas e a produção de substâncias antimicrobianas foi indicada por halos de inibição em volta dos “spots” das colônias. Os halos de inibição  $\geq 6$  mm foram considerados indicativos de atividade inibitória.

O segundo método utilizado para a seleção dos microrganismos foi o bioensaio de sobreposição em ágar descrito previamente por Hentschel e colaboradores (2001), com modificações. Brevemente, 20 µl de cada microrganismo isolado foi inoculado em “spot” em duas placas de Petri contendo meio MA 3%, ambas foram incubadas por 16 horas, sendo uma a 24°C e outra a 28°C. Foram 6 “spots” por placa de Petri, cada “spot” representando um isolado diferente. Ao mesmo tempo em que as placas foram incubadas, a estirpe indicadora foi cultivada em meio líquido MB 3% e incubadas por 16 horas em ambas as temperaturas de 24°C e 28°C. Após as 16 horas de incubação, 100 µl da estirpe indicadora de cada temperatura foi inoculada com auxílio da alça de Drigalski em placa de Petri contendo meio MA 3% e deixadas secar dentro do fluxo laminar por 1 hora. Após visivelmente secas, os “spots” dos microrganismos isolados foram cortados com um tubo de ensaio estéril e colocados com o lado de crescimento bacteriano sobre as placas previamente inoculadas com a estirpe indicadora. Os “spots” dos microrganismos isolados crescidos a 24°C e 28°C foram colocados respectivamente nas placas com a indicadora crescidas nas mesmas temperaturas. As placas foram incubadas nas temperaturas nas quais estavam anteriormente de 24°C e 28°C por 5 dias. Após o tempo de incubação, os halos de inibição  $\geq 6$  mm foram considerados indicativos de atividade inibitória. O bioensaio foi realizado a 24°C e 28°C para correlacionar com a patogenicidade dependente de temperatura da *V. coralliilyticus* (BEN-HAIM et al., 2003b).

#### 4.4.2 Teste da catalase

Esse teste consiste na detecção de catalase em bactérias. Uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% (v/v) foi depositada numa lâmina de microscópio; uma amostra (uma gota de cultura líquida do microrganismo a testar) foi então esfregada nesta gota. Caso aparecem bolhas, o organismo é catalase-positivo (possui catalase) (PERESI et al., 2006). As bolhas são formadas pelo oxigênio molecular libertado na reação da catalase.

#### 4.4.3 Presença de genes relacionados a fixação de nitrogênio, desnitrificação e degradação de DMSP

As análises da presença dos genes relacionados a fixação do nitrogênio, desnitrificação e degradação de DMSP nas estirpes foram feitas através do método de reação em cadeia da polimerase (PCR). Os iniciadores utilizados para amplificação de uma região de 360 pares de base do gene *nifH*, um gene que codifica uma enzima envolvida na fixação de nitrogênio atmosférico em uma forma disponível de nitrogênio para organismos vivos, foram os PolF (5'- TGC GAT CCG AAA GCC GAC TC - 3') e PolR (5'- ATG GCC ATC ATT TCA CCG GA - 3'). O protocolo seguido para as reações e programa de PCR foi o mesmo previamente descrito por Poly e colaboradores (2001).

Para amplificação de uma região com 473 pares de bases do gene nitrito redutase (*nirK*), gene que codifica uma enzima chave no processo de desnitrificação, foram utilizados os iniciadores F1aCu (5'- ATC ATG GTC CTG CCG CG - 3') e o R3Cu (5'- TTG GTG TTA GAC TAG CTC CG - 3'), e o protocolo seguido para as reações e programa de PCR foi o mesmo descrito por Hallin e Lindgren (1999).

Na amplificação de uma região de 537 pares de base do gene *dmdA*, gene que codifica a DMSP desmetilase que medeia o primeiro passo de degradação do DMSP pela via de desmetilação (HOWARD et al., 2006), foram utilizados os iniciadores D/all-spFP (5'- TAT TGG TAT AGC TAT - 3') e o D/all-spRP (5'- TAA ATA AAA GGT AAA TCG C- 3'). O protocolo seguido para as reações e programas de PCR foi o mesmo descrito por Varaljay e colaboradores (2010).

Os produtos das reações de PCR foram aplicados em gel de agarose 1,2% e depois visualizados no transiluminador UV (*BioAmerica - EUA*) para confirmar se houve amplificação dos genes. Em todas as 3 reações de PCR foram utilizadas controle negativo e positivo para validar as reações.

#### 4.5 Extração de DNA Genômico

Todos os isolados que apresentaram resultados positivos nos testes de seleção dos BMCs foram inoculados em 3 ml de meio MB e incubados por 16 horas a 28°C sob agitação de 120 rpm. Após 16 horas de incubação, foi realizada a extração do DNA dos isolados, pelo método de lise química e enzimática seguindo o protocolo do fabricante do kit comercial “Wizard Genomic DNA extraction Kit” (Promega).

#### 4.6 PCR e Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA de todas as estirpes foi realizado a partir do produto de PCR obtido utilizando-se os iniciadores 27f (5'- AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG - 3') e 1492r (5' – GTT TAC CTT GTT ACG ACT T – 3'). As reações de 50µL foram realizadas com uma mistura de tampão da enzima Taq-polimerase 1x, 2,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 50 µmol de cada dNTP, 20 µmol de cada iniciador, 2,5 U Taq polimerase (Fermentas) e água ultrapura (Milli-Q) estéril. Em cada reação, foram aplicados cerca de 50 ng de DNA. O programa de PCR utilizado compreende um ciclo de desnaturação das fitas de DNA por 3 min a 94°C, seguidos de 35 ciclos de 40s a 94°C, 1 min a 55°C e 2 min a 72°C, e da extensão a 72°C por 10 min. O gene amplificado foi purificado em gel de agarose 1.6% com o auxílio do kit de purificação “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare). A reação de sequenciamento foi realizada pela empresa Macrogen, localizada em Seul, Coreia do Sul. As sequências obtidas foram comparadas com todas as sequências de DNA conhecidas, depositadas em bancos de dados não redundantes, utilizando-se o programa BLASTN (ALTSCHUL et al., 1997; ALEJANDRO et al., 2001), considerando a maior homologia entre a sequência obtida e as sequências depositadas, como indicador na identificação molecular das espécies. Os isolados que apresentaram sequência com mais de 99% de similaridade com aquelas depositadas no Genbank foram considerados como pertencentes à mesma espécie. Isolados com sequências com

similaridade inferior a 99% foram considerados filogeneticamente próximos à espécie indicada.

#### 4.7 Seleção do consórcio de BMCs

O consórcio foi montado baseado no resultado dos testes para seleção dos BMCs descritos no item 3.4. Todos os isolados que apresentaram resultado positivo em qualquer um dos 3 testes (itens 3.4.1, 3.4.2 e 3.4.3) foram separados. Os resultados dos 3 testes foram cruzados e os isolados que apresentavam mais características de ser um BMC foram escolhidos para o sequenciamento. Após o sequenciamento, as estirpes foram selecionadas para o consórcio baseadas em suas descrições prévias na literatura. Foram realizados testes de antagonismo entre os microrganismos isolados com o propósito de saber se havia inibição entre eles. Se houvesse inibição, o microrganismo isolado com menor potencial probiótico seria excluído do consórcio.

#### 4.8 Curva de crescimento dos isolados

Para determinação da curva de crescimento dos isolados pré-selecionados para montagem do consórcio, a quantificação celular foi estimada através da avaliação da densidade óptica, com comprimento de onda de 600 nm, e posterior contagem em placas (TORTORA, 2005).

Foi realizado um pré-inóculo das bactérias em tubos de vidro contendo 5 ml de meio MB 3%. Estes tubos foram mantidos sob agitação constante (100 rpm) a uma temperatura de 26-28° C por 16 horas. Alíquotas de todas as culturas foram retiradas e a densidade óptica (DO) foi verificada por absorbância em filtro de 600 nm. Cálculos foram realizados e as cepas foram inoculadas de modo a todas iniciarem a curva de crescimento em DO 0,02. Todos os inóculos foram realizados em triplicata em *Erlenmeyers* de 125 ml contendo 50 ml de meio MB 3% e mantidos sob agitação constante (100 rpm) a uma temperatura de 26-28° C.

Para realizar a análise de DO, uma alíquota foi retirada nos tempos de 6h, 12h, 20h, 28h, 38h e 48h de crescimento, e a absorbância foi determinada em filtro de 600 nm no espectrofotômetro UV Visível da Shimadzu (UV-1800 model). Quando necessário essas culturas foram diluídas para que permanecessem dentro do limite de detecção do equipamento.

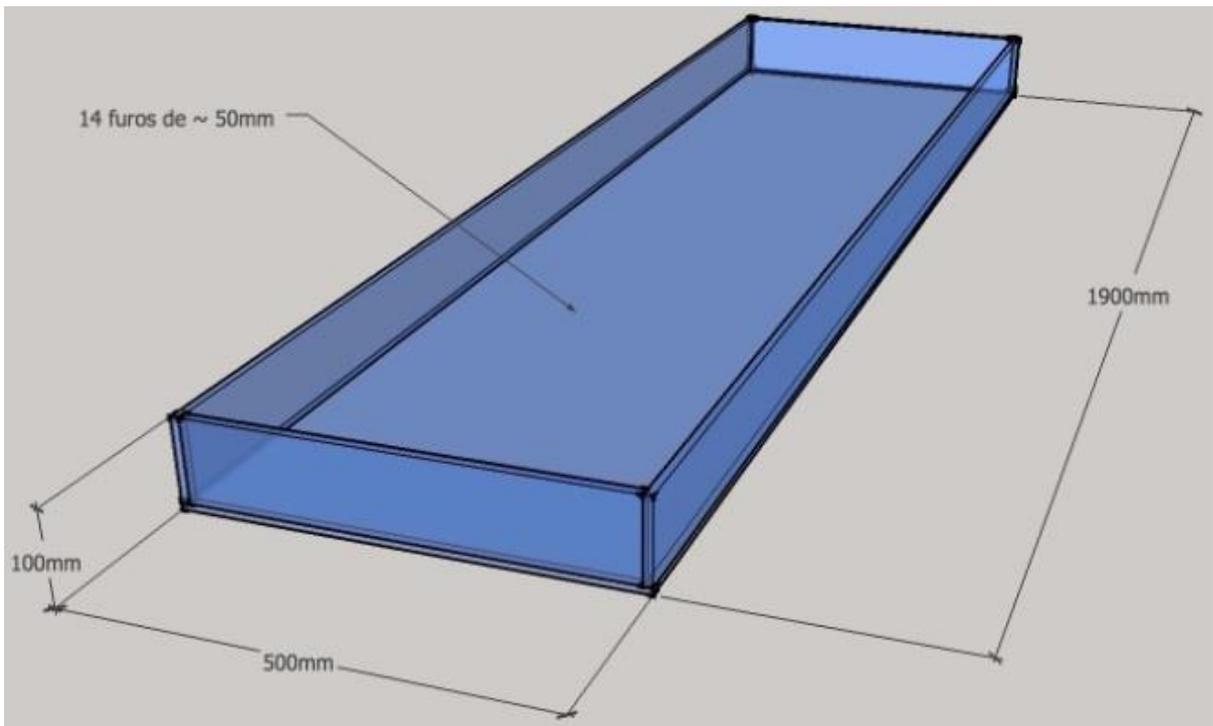
Concomitantemente, o número de unidades formadoras de colônia (UFC) também foi calculado nos mesmos intervalos de coleta e uma estimativa do número total de células foi realizada. Foram realizadas diluições seriadas de cada intervalo de coleta e cada uma das réplicas foi plaqueada em triplicata em quatro diluições diferentes com ordem de grandeza de 10 vezes. O método de contagem e plaqueamento utilizado foi o método da gota. Brevemente, 10 µl de cada uma das diluições são aplicadas em meio de cultura MA e após o crescimento, as colônias foram contadas com auxílio de um contador de colônias (MILES & MISRA, 1938). Os resultados foram posteriormente normalizados para o volume de um ml de meio para se chegar a uma estimativa da quantidade de células presente em cada intervalo de coleta.

#### 4.9 Preparo do consórcio de BMCs

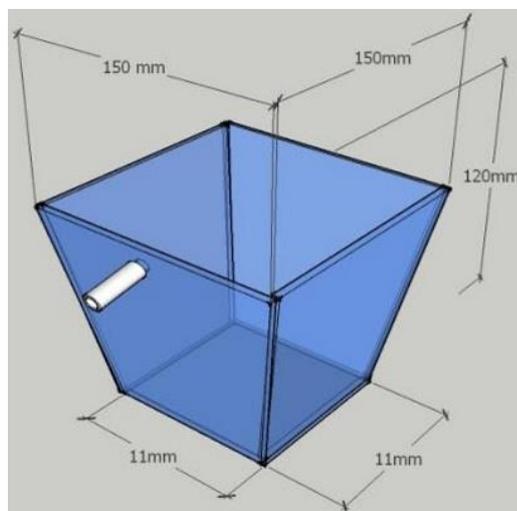
As estirpes escolhidas para fazerem parte do consórcio foram primeiramente cultivadas em meio sólido para avaliação de pureza e condição de crescimento. Posteriormente, afim de se obter uma massa celular bacteriana para ser utilizada como inóculo, as estirpes foram crescidas separadamente em 100 ml de meio MB 3% dentro de *Erlenmeyers* de 250 ml e incubadas sob agitação de 100 rpm a temperatura de 26-28°C pelo tempo necessário para atingir a concentração estipulada para o inóculo do consórcio no experimento. Após atingirem a concentração, as células foram coletadas por centrifugação e lavadas por duas vezes com água salina estéril (0.85% g/v de NaCl) para a eliminação de resíduos do meio de cultura. Todas as células de cada cultura foram homogeneizadas juntas e ressuspensas em um volume final de 40 ml de salina e estocadas a 4°C até seu uso no experimento.

#### 4.10 Estrutura de mesocosmo para a rodada experimental

Os procedimentos experimentais foram realizados no Centro para Estudos de Biorremediação de Óleo em Ambientes Marinhos CENPES/UFRJ que está localizado no município de Armação dos Búzios. Para a montagem da estrutura do mesocosmo foram utilizados quatro aquários retangulares (190 cm x 50 cm x 10 cm) com vidros de 8 mm de espessura (figura 11). Estes serviram como banho-maria para 40 aquários menores de 1,5 litros em formato de trapézio (15 cm x 11 cm x 12 cm) com vidros de 4 mm de espessura (figura 12).



**Figura 11:** Representação em 3D do banho-maria utilizado no experimento gerada com auxílio do programa SketchUp 2015.



**Figura 12:** Representação em 3D do aquário utilizado no experimento gerada com auxílio do programa SketchUp 2015.

Cada banho-maria comportava 10 aquários onde os corais utilizados ficaram incubados durante a rodada experimental. Os banhos-maria com os aquários foram sustentados por uma estrutura única de madeira com 90 cm de altura, 50 cm de largura e 410 cm de comprimento. Logo abaixo da estrutura de madeira, 40 caixas de plástico de 26 litros foram colocadas sobre quatro estruturas de madeira de 50 cm de altura, 50 cm de largura e 450 cm de comprimento (figura 13).



**Figura 13:** Estrutura completa utilizada na rodada experimental. A, estrutura de madeira para suporte das caixas de 26 litros. B, caixas de 26 litros utilizadas para circulação de água. C, canos de PVC para distribuição de ar para cada aquário. D, sombrite utilizado para diminuir a incidência de luz sobre o mesocosmo.

Cada aquário teve sua própria caixa de 26 litros que foi utilizada para circulação de água, sendo que cada caixa comportava uma bomba de aquário Mini A (Sarlor) que fazia a elevação da água da caixa até o aquário e a água retornava para a caixa por um furo de 15 mm de diâmetro no vidro do aquário. Dessa forma, a circulação de água ficou com a vazão de 5 vezes o volume do aquário por hora. Uma turbina de ar HG-370 (Sun Sun) foi utilizada para toda a estrutura com o intuito de aumentar a circulação

de água e a oxigenação em cada aquário. Um cano de PVC foi ligado na saída da turbina e por todo corpo do cano diversas mangueiras de silicone e controladores de fluxo de ar foram conectadas, cada aquário possuía sua própria mangueira (figura 14).



**Figura 14:** Estrutura de ligação de mangueiras em cada aquário. A, mangueiras azuis: saída de água do aquário para a caixa de 26 litros. B, mangueira de silicone abaixo: era ligada à bomba de água dentro da caixa e servia como entrada de água nos aquários. C, mangueira de silicone acima: saída de ar.

Cada aquário teve sua própria caixa de 26 litros que foi utilizada para circulação de água, sendo que cada caixa comportava uma bomba de aquário Mini A (Sarlo) que fazia a elevação da água da caixa até o aquário e a água retornava para a caixa por um furo de 15 mm de diâmetro no vidro do aquário. Dessa forma, a circulação de água ficou com a vazão de 5 vezes o volume do aquário por hora. Uma turbina de ar HG-370 (Sun Sun) foi utilizada para toda a estrutura com o intuito de aumentar a circulação de água e a oxigenação em cada aquário. Um cano de PVC foi ligado na saída da turbina e por todo corpo do cano diversas mangueiras de silicone e controladores de fluxo de ar foram conectadas, cada aquário possuía sua própria mangueira (figura 14).

A iluminação utilizada durante todo o experimento foi luz natural. Um sombrite 70 (figura 13) foi colocado logo acima da estrutura dos banhos-maria para que a intensidade de luz que chegasse aos corais dentro dos aquários não ultrapassasse  $250 \mu\text{moles.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ao meio dia, horário com maior incidência de luz sobre o mesocosmo. Esse valor foi baseado nas medidas de intensidade de luz dos aquários doadores de fragmentos de corais para esse estudo.

Para o resfriamento da água do banho-maria foi utilizado uma unidade resfriadora chiller 3/4 HP (Gelaqua) que manteve uma caixa de 1000 litros de água doce na temperatura desejada. Bombas de aquário Better 2000 (Sarlor) fizeram o envio da água da caixa de 1000 litros até os banhos-maria e a água retornava à caixa de 1000 litros por dois furos de 50 mm localizados na lateral de cada banho-maria.

O aquecimento da água do banho-maria, caso fosse necessário, foi através do uso de seis termostatos de 100 W (Atman) que ficavam localizados dentro de cada banho-maria. A circulação e homogeneização da água dentro de cada banho-maria, para que toda água mantivesse a mesma temperatura, foi feito por duas bombas de aquário SB 1000A (Sarlor).

O controle da temperatura dos banhos-maria foi feito através do controlador Full Gauge MT-518ri que ficava ligado aos termostatos e às bombas que enviavam a água resfriada da caixa de 1000 litros para os banhos-maria. Dependendo da temperatura utilizada nos banhos-maria o controlador ligava ou desligava as bombas ou o termostato, dessa forma a temperatura desejada se mantinha sempre constante.

A água utilizada para os corais durante todo o experimento foi água do mar artificial (OceanTech) com a salinidade de 35 a 37 ppm e o volume utilizado foi de 10 litros por caixa.

#### 4.11 Aquisição do patógeno

A estirpe *Vibrio coralliilyticus* YB foi adquirida junto à DMSZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen and Zellkulturen GmbH) da Alemanha, uma organização de pesquisas que providencia materiais biológicos sem fins lucrativos.

#### 4.12 Aquisição e fragmentação dos corais

Parte das colônias de *Pocillopora damicornis* utilizadas no experimento foi doada por aquaristas e parte foi comprada diretamente de loja de aquarismo. As colônias doadas pelo aquarista Marcelo Cunha foram coletadas de seu aquário particular (figura 15) em sua residência no Rio de Janeiro. As colônias compradas (figura 16) foram adquiridas junto ao Bernardo na sua loja Aqua Rio&Mar localizada na cidade de Cabo Frio – RJ.



**Figura 15:** Aquário particular de criação de corais do aquarista Marcelo Cunha. Colônias de *P. damicornis* com cor roxa dentro do círculo foram doadas para o experimento.

No dia em que as colônias foram adquiridas elas eram levadas até Búzios, local onde o mesocosmo foi montado, e então fragmentadas em pedaços com cerca de 2 centímetros de comprimento. Para o corte dos fragmentos foram utilizadas luvas, pinças e alicate de corte, todos previamente esterilizados para evitar contaminação por microrganismos exógenos ao coral. Os fragmentos então foram colados em

pequenos azulejos de 5 centímetros de área com auxílio de cola de secagem rápida (“Super Bonder”) (figura 17).



**Figura 16:** Colônias de *P. damicornis* adquirida na loja Aqua Rio&Mar em Cabo Frio – RJ.



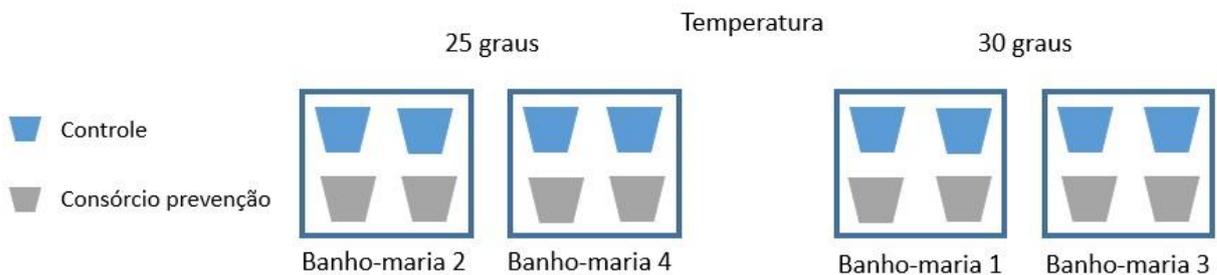
**Figura 17:** Fragmentos colados com auxílio de cola de secagem rápida no azulejo.

#### 4.13 Rodada experimental

Dois experimentos foram corridos durante a rodada experimental. O primeiro correlacionando efeito do aumento da temperatura sobre os corais nos tratamentos com consórcio e sem consórcio, e o segundo correlacionando efeito da adição de patógeno sobre os corais nos tratamentos com e sem consórcio.

##### 4.13.1 Experimento de aumento de temperatura

Quatro aquários em cada banho-maria foram utilizados para esse experimento. Foram dois tratamentos em quadruplicata em duas temperaturas diferentes (25°C e 30°C) (Figura 18): i, aquários com corais sem adição do consórcio (controle - CTL); e ii, aquários com corais mais adição do consórcio (consórcio prevenção “Cp” – intuito de prevenir um possível branqueamento ou aparição de doença.).



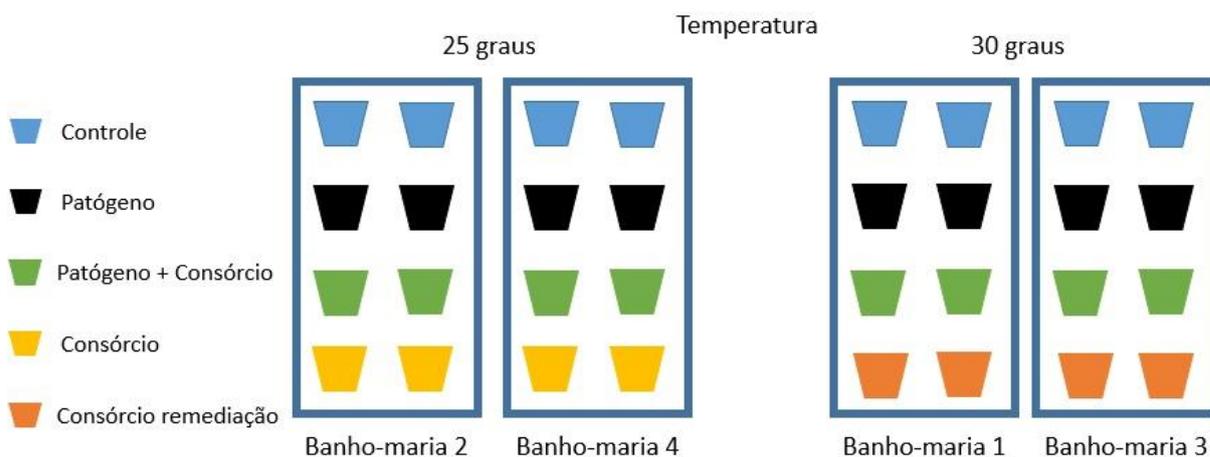
**Figura 18:** Esquema dos aquários no experimento de aumento de temperatura.

##### 4.13.2 Experimento com adição de patógeno

Oito aquários em cada banho-maria foram utilizados para esse experimento. Foram 4 tratamentos em quadruplicata em duas temperaturas diferentes (25°C e 30°C) (Figura 19): i, aquários com corais sem adição de consórcio ou patógeno (controle - CTL); ii, aquários com corais e a inclusão do patógeno *Vibrio coralliilyticus* YB (patógeno - P); iii, aquários com corais e a inclusão do consórcio (“consórcio - C” na temperatura de 25 °C e “consórcio remediação - Cr” na temperatura de 30 °C) (Cr – intuito de remediar um branqueamento ou uma doença que tenha surgido); iv,

aquários com corais, inclusão do patógeno *Vibrio coralliilyticus* YB e inclusão do consórcio (patógeno + consórcio - PC).

A escolha da *V. coralliilyticus* YB como o patógeno modelo da rodada experimental é pelo fato dessa estirpe ter sido isolada da mesma espécie de coral utilizada nesse estudo, a *P. damicornis* (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2002).



**Figura 19:** Esquema dos aquários no experimento com adição de patógeno.

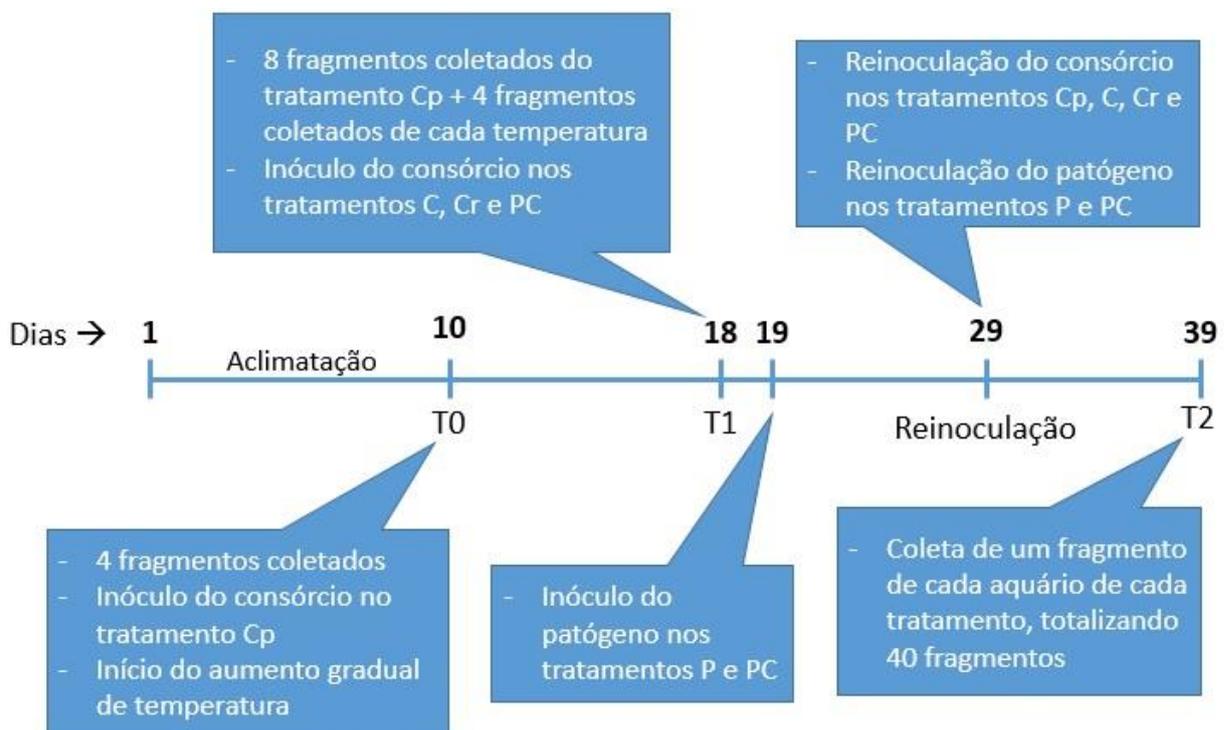
#### 4.13.3 Cronograma do experimento e visão geral do desenho experimental

A rodada experimental ocorreu em um período de 39 dias contando com o período de aclimação e com os 3 tempos distintos de coletas (T0, T1 e T2) que tiveram início no dia que se iniciou o aumento gradual de temperatura.

O dia 1 foi o início da aclimação, portanto, um dia após a fragmentação dos corais e sua distribuição dentro dos 40 aquários. O período de aclimação durou 10 dias e todos os quatro banhos-maria permaneceram na mesma temperatura de 25°C. No décimo dia deu-se início ao aumento diário de 1 grau de temperatura até atingir 30°C nos dois banhos-maria escolhidos aleatoriamente. A escolha dos banhos-maria para as temperaturas de 25 e 30°C foi aleatória, ficando a 25°C os banhos-maria 2 e 4, e a 30°C os banhos-maria 1 e 3. Além disso, foi realizado o primeiro tempo de coleta (T0 – um fragmento aleatório de um aquário aleatório de cada banho-maria foi coletado, totalizando 4 fragmentos na primeira coleta) e também, foi inoculado o consórcio apenas nos 8 aquários relacionado ao tratamento “consórcio prevenção”.

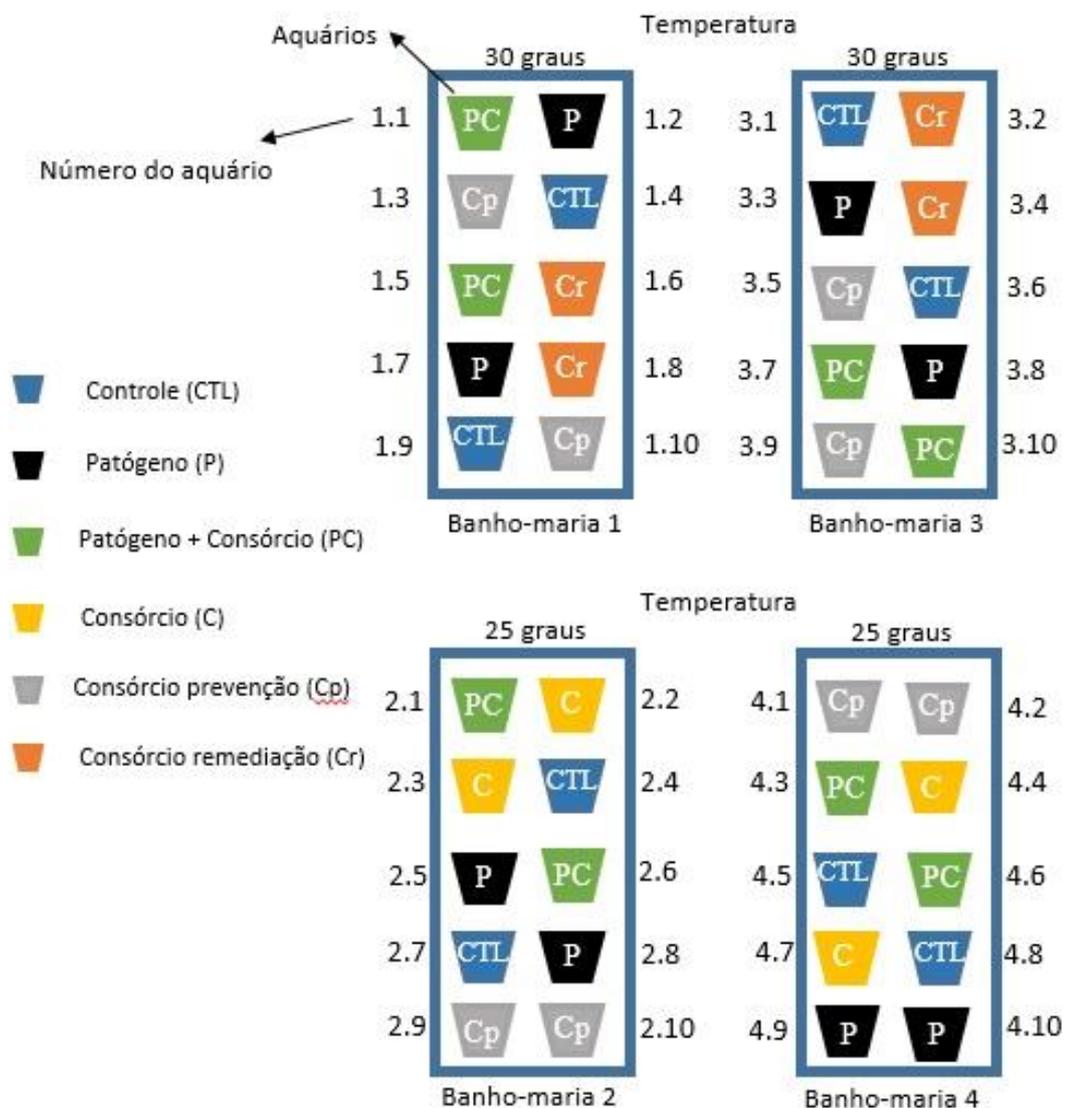
No décimo quinto dia de experimento a temperatura de 30°C foi atingida e mantida até o final do experimento. Três dias após (18° dia) alcançar a temperatura de 30°C, foi realizado o segundo tempo de coleta (T1 – dois fragmentos aleatórios de cada banho-maria foram coletados, ou seja, 4 fragmentos por temperatura mais 1 fragmento de cada aquário pertencente ao tratamento “consórcio prevenção”, totalizando 16 fragmentos na segunda coleta). Nesse dia, foi inoculado consórcio nos tratamentos “consórcio”, “consórcio remediação” e “patógeno + consórcio” e no dia seguinte ao inóculo do consórcio, ou seja, no 19° dia foi inoculado o patógeno nos tratamentos “patógeno + consórcio” e “patógeno”.

No 29° dia de experimento, tanto o consórcio quanto o patógeno foram reinoculados nos tratamentos dos quais eles pertenciam. No 39° dia, foi realizada a última coleta (T2 – 1 fragmento de cada aquário de todos os tratamentos, totalizando 40 fragmentos). Todos fragmentos dos corais que foram coletados nos 3 tempos foram cuidadosamente retirados dos aquários e imediatamente congelados em nitrogênio líquido e depois mantidos a -80°C para posterior extração de DNA. A figura 20 sumariza todo cronograma experimental descrito acima.



**Figura 20:** Representação do cronograma do experimento.

As posições dos aquários com os diferentes tratamentos foram sortidas de forma aleatória para evitar qualquer tipo de interferência nos resultados além de cada aquário possuir um número de identificação. Ambos os experimentos de temperatura como o de presença de patógeno foram corridos juntos, portanto, um tratamento controle foi utilizado em conjunto para os dois. A figura 21 exemplifica como ficaram dispostos os dois experimentos juntos nos banhos-maria já com as posições e a numeração correta dos aquários.

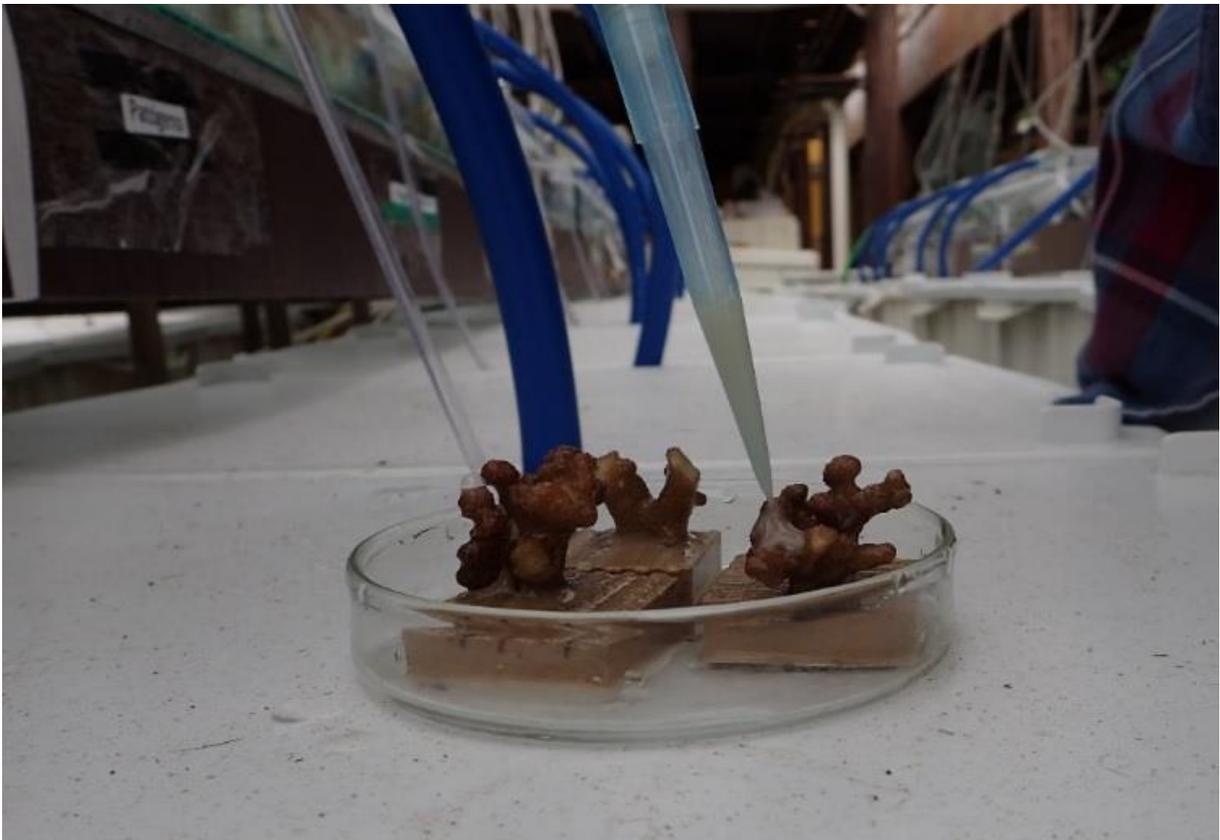


**Figura 21:** Esquema dos aquários e tratamentos de ambos os experimentos de temperatura e patógenos juntos.

#### 4.14 Inóculo do consórcio e do patógeno

O protocolo utilizado para a inoculação do consórcio e do patógeno nos tratamentos foi o mesmo utilizado em experimentos anteriores com inóculo de diferentes concentrações descrito previamente por BEN-HAIM & ROSENBERG (2002) e BEN-HAIM e colaboradores (2003b), com modificações. Os azulejos com fragmentos de corais foram removidos do aquário para placas de Petri estéreis e logo em seguida, 1 ml (volume final por aquário) da *V. coralliilyticus* YB na concentração de  $10^4$  bactérias/ml e/ou 1 ml (volume final por aquário) do consórcio homogeneizado na concentração de  $10^7$  bactérias/ml foram inoculados diretamente nos fragmentos, evitando o contato ao tecido do coral (figura 22). Um minuto após a inoculação, os fragmentos eram cuidadosamente devolvidos aos aquários. Os fragmentos controles foram tratados da mesma forma, exceto que a inoculação foi de 1 ml de água do mar artificial estéril.

Ao final do experimento, a água de todos os tratamentos incluindo o controle foram neutralizados com cloro 4% para evitar qualquer risco de contaminação do ambiente com o consórcio e com o patógeno.



**Figura 22:** Momento da inoculação do consórcio sobre os corais.

#### 4.15 Análises dos parâmetros físico-químico da água

Os parâmetros físico-químicos de pH, concentração de oxigênio dissolvido e salinidade da água de cada aquário eram medidas a cada 3 dias. Para as análises de pH foi utilizado o medidor de pH portátil 826 pH mobile (*Metrohm*), para a concentração de oxigênio dissolvido foi utilizado o oxímetro YSI Pro DO (*Clean*) e para as medidas de salinidade o condutivímetro YSI Pro30 (*Clean*).

Para evitar qualquer contaminação entre os tratamentos durante as medidas dos parâmetros entre os aquários, cada aquário possuía seu próprio copo descartável de 700 ml. No momento das medições, cerca de 300 ml de água era cuidadosamente retirada de cada aquário com auxílio da própria bomba d'água que fazia a circulação das caixas de 26 litros para os aquários e nesse volume de água eram feitas as medidas dos 3 parâmetros mencionados acima. Após tiradas as medidas, a água era descartada e o mesmo volume retirado de cada aquário era repostado com água do mar sintética.

#### 4.16 Avaliação da saúde dos corais

Para a avaliação da saúde dos fragmentos dos corais foram abordadas duas diferentes metodologias: quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas associadas ao coral e observação morfológica do coral.

##### 4.16.1 Quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas

A quantificação da capacidade fotossintética foi determinada pelo rendimento quântico máximo do Fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) das zooxantelas associadas ao coral. Os parâmetros fotossintéticos das zooxantelas foram estimados uma vez por dia durante a noite, com o auxílio do fluorímetro subaquático de pulso e amplitude modulada (Diving-PAM, Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Alemanha), ajustado com a seguinte configuração: “*Measuring Light Intensity*” (MI) = 5; “*Saturation Pulse Intensity*” (SI) = 8; “*Saturation Pulse Width*” (SW) = 0,8; “*Gain*” (G) = 4; “*Damping*” (D) = 3. A intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (Irradiância ou PAR) dentro de cada

recipiente foi medida três vezes por dia (9, 13 e 17 horas) usando um “*Fiber Quantum Sensor*” (diâmetro de 1 mm), conectado ao Diving-PAM.

Para determinação do rendimento quântico máximo do FSII a partir dos valores de fluorescência denominados de  $F_o$  e  $F_m$ , cada amostra foi aclimatada ao escuro por 20 min. Enquanto a fluorescência basal ou mínima ( $F_o$ ) corresponde ao sinal emitido sob iluminação modulada não actínica ( $\sim 1,5 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ), a fluorescência máxima ( $F_m$ ) foi obtida mediante exposição a um pulso de luz saturante ( $\sim 6.000 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ) na presença da luz modulada. A diferença entre esses valores extremos corresponde ao valor da fluorescência vari\u00e1vel ( $F_v$ ) e a raz\u00e3o  $F_v/F_m$  representa o rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo do FSII, pois a perman\u00eancia no escuro resulta no desaparecimento dos processos n\u00e3o fotoqu\u00edmicos de dissipac\u00e3o da energia de excita\u00e7\u00e3o do FSII. Cabe mencionar que, \u00e0 temperatura ambiente, a quase totalidade da fluoresc\u00eancia \u00e9 proveniente da clorofila “a” associada ao Fotossistema II (KRAUSE & WEISS, 1991). Os resultados foram comparados atrav\u00e9s de an\u00e1lises de vari\u00e2ncia param\u00e9tricas (ANOVA) fatoriais por meio do software Statistica 7 (StatSoft).

#### 4.16.2 Observa\u00e7\u00e3o morfol\u00f3gica do coral

As observa\u00e7\u00f5es morfol\u00f3gicas dos fragmentos dos corais foram realizadas a cada 3 dias com base nos mesmos par\u00e2metros de an\u00e1lises utilizados em estudos preliminares (BEN-HAIM et al., 2003a), com modifica\u00e7\u00f5es. Brevemente, o n\u00edvel de lise do tecido (expresso em porcentagem) foi determinado visualmente atrav\u00e9s da estimativa do tamanho da \u00e1rea doente em compara\u00e7\u00e3o com o tamanho total do tecido. O fragmento do coral foi considerado lisado quando ao menos 50% do tecido estava degradado, deixando apenas o esqueleto aparente. Foi considerado branqueado quando o tecido do coral aparentava estar totalmente transparente. Dentro do conceito de branqueamento, a porcentagem da \u00e1rea branqueada foi estipulada visualmente atrav\u00e9s da estimativa do tamanho da \u00e1rea branqueada em compara\u00e7\u00e3o com o tamanho total do fragmento.

Fotos de todos fragmentos foram tiradas durante a observa\u00e7\u00e3o morfol\u00f3gica com a m\u00e1quina fotogr\u00e1fica Olympus tough tg 4. Para melhor resolu\u00e7\u00e3o das imagens nas fotos, cada azulejo com o (s) fragmento (s) era retirado do seu aqu\u00e1rio no banho-

maria e colocado em outro aquário contendo a mesma água do tratamento. Esse aquário era colocado sobre uma mesinha ao ar livre e na parte de trás do aquário um papel preto com objetivo de destacar o coral nas fotos (figura 23). Em média, 4 fotos de cada coral eram tiradas de diferentes posições para a completa visualização de todo o fragmento.



**Figura 23:** Esquema montado para tirar as fotos dos fragmentos dos corais. 1: mesa para apoio do aquário. 2: papel preto colocado atrás do aquário. 3: aquário utilizado para colocar o (s) azulejo (s) com o (s) fragmento (s) de coral.

#### 4.17 Análise estatística dos dados

Todos os dados foram testados em relação à normalidade dos resíduos. Quando essa condição foi respeitada, foi executada a análise de variância seguida do teste de Tukey para diferenciação de médias (ao nível de 5% de probabilidade) nos casos de diferenças significativas. Todos os testes foram feitos com a utilização do programa *Statística 7* (StatSoft).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Isolamento dos microrganismos

Utilizando o método de isolamento descrito no item 3.2 da metodologia foi possível a obtenção de 61 isolados do coral *P. damicornis* e 98 isolados da água dos aquários onde estavam os corais, totalizando 159 isolados. Destes, 30 isolados do coral e 23 isolados da água foram escolhidos aleatoriamente e utilizados para as análises subsequentes de seleção dos BMCs.

### 5.2 Seleção dos microrganismos benéficos para corais

No teste da catalase o número de isolados que apresentaram atividade, portanto, realizando a quebra do peróxido de hidrogênio e conseqüentemente o borbulhamento devido a liberação de O<sub>2</sub>, foi de 44 entre os 53 isolados testados para as análises de seleção dos BMCs (tabela 2 e 3). Dentre os 53 isolados utilizados, apenas 1 isolado da água do aquário apresentou atividade antimicrobiana contra o patógeno modelo *V. coralliilyticus* YB (tabela 3). Ainda assim, a formação de halo de inibição foi de 6 mm, considerada baixa por estar no limite do tamanho do halo para confirmação de atividade antagonista da estirpe (GIAMBIAGI-DEMARVAL et al., 1990).

Na análise da presença do gene *nifH*, relacionado a fixação do nitrogênio, 11 isolados de coral e 2 isolados da água apresentaram resultado positivo. A quantidade de isolados que apresentaram resultado positivo para a presença do gene *nirK*, relacionado a via de desnitrificação do ciclo do nitrogênio foi menor, sendo 3 isolados do coral e 1 da água (tabela 2 e 3). E por fim, o resultado quanto a presença do gene *dmdA*, envolvido na via de degradação do DMSP, foi o mesmo do teste de antagonismo onde apenas 1 isolado de água apresentou amplificação (tabela 3).

**Tabela 2:** Resultado das análises da seleção dos BMCs nos isolados do coral. Prefixo no código: M - isolado do coral de Nova Friburgo – RJ; e C - isolado do coral de Peruíbe – SP.

<b>Código do isolado do coral</b>	<b>Presença de <i>nifH</i></b>	<b>Atividade positiva da catalase</b>	<b>Presença de <i>nirK</i></b>
M00 02		X	
M00 05			
M01 02		X	
M05 02		X	
M06 01	X	X	
M06 02	X	X	
M06 04	X	X	
M07 03		X	
M09 01	X		
M10 01	X	X	
M10 03	X	X	
M12 01	X	X	
M14 01		X	
M16 01	X	X	
M16 02		X	
M17 01		X	X
M17 02		X	
M18 02		X	
M19 01		X	
M20 01			
M21 01			
M21 02			X
M21 03	X	X	X
M22 01	X	X	
M23 01	X	X	
M24 01		X	
C2 01			
C2 02		X	
C2 03			
C4 01		X	

**Tabela 3:** Resultado das análises da seleção dos BMCs nos isolados da água do aquário. Prefixo no código A - isolado da água do aquário de Nova Friburgo – RJ; e AS - isolado da água do aquário de Peruíbe – SP.

Código do isolado da água	Presença de <i>nifH</i>	Atividade positiva da catalase	Presença de <i>nirK</i>	Presença de <i>dmdA</i>	Atividade antagonista
A01 01		X			
A01 02					
A02 03					
A03 03		X		X	
A04 03		X			
A05 01					
A08 02		X	X		
A08 03		X			
A09 01		X			
A11 01		X			
A11 04					
A11 05		X			
AS01 01		X			
AS01 03		X			
AS04 02		X			
AS04 04		X			
AS07 01		X			
AS09 05					
AS09 06	X	X			X
AS09 08					
AS11 01	X				
AS14 01					
AS15 02					

### 5.3 Sequenciamento de DNA dos isolados e montagem do consórcio

A partir do produto da amplificação do gene que codifica a subunidade 16S do RNA ribossomal (*rrs*) e de sua purificação, o sequenciamento do DNA foi realizado de 19 isolados microbianos escolhidos com base nos resultados apresentados nas

tabelas 2 e 3. As sequências obtidas foram colocadas no banco de dados *Genbank* do programa BLASTn para a verificação da similaridade das sequências dos isolados desse estudo com aquelas presente no *Genbank* (Tabela 4).

Tabela 4: Características e classificação dos isolados baseando-se na identidade da sequência mais similar encontrada no *GenBank* utilizando-se o NCBI-BLASTn.

<b>Código</b>	<b>Identificação</b>	<b>Identidade</b>	<b>nifH</b>	<b>Catalase</b>	<b>nirK</b>	<b>dmdA</b>	<b>Antagonista</b>
M0601	<i>Vibrio sp.</i> (KU725841.1)	97%	X	X			
M0602	<i>Vibrio sp.</i> (KX453261.1)	99%	X	X			
M0604	<i>Vibrio sp.</i> (KU725841.1)	99%	X	X			
M1001	<i>Vibrio sp.</i> (KU725841.1)	98%	X	X			
M1003	<i>Vibrio sp.</i> (KX453261.1)	100%	X	X			
M1201	<i>Vibrio sp.</i> (KX453261.1)	99%	X	X			
M1601	<i>Vibrio sp.</i> (KR003734.1)	99%	X	X			
M1701	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> (KP016625.1)	99%		X	X		
M1702	<i>Vibrio harveyi</i> (KU245709.1)	99%		X			
M2102	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> (KU955357.1)	100%			X		
M2103	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> (KX806641.1)	100%	X	X	X		
M2201	<i>Vibrio sp.</i> (JX280417.1)	99%	X	X			
M2301	<i>Vibrio harveyi</i> (CP014038.1)	100%	X	X			
A0303	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> (KX806641.1)	100%		X		X	
A0802	<i>Pseudoalteromonas sp.</i> (KU955357.1)	99%		X	X		
AS0402	<i>Cobetia marina</i> (KP236304.1)	99%		X			
AS0906	<i>Vibrio ponticus</i> (KU249214.1)	99%	X	X			
AS0908	<i>Vibrio sp.</i> (EU372917.1)	97%					X
AS1101	<i>Halomonas taeanensis</i> (KJ161492.1)	100%	X				

Os resultados demonstram que mais da metade (63%) dos isolados escolhidos para o sequenciamento foram identificados como pertencendo ao gênero *Vibrio*. Dentro os outros 37% dos isolados, 27% foram identificados como pertencentes ao gênero *Pseudoalteromonas*, 5% ao gênero *Halomonas* e 5% ao gênero *Cobetia*. Esses dois últimos gêneros pertencem à mesma família de bactérias, *Halomonadaceae*.

Na montagem do consórcio, todas estirpes que foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio* foram excluídas, devido ao fato desse gênero ser descrito por possuir diversas espécies patogênicas para coral (VIDAL-DUPIOL et al, 2011a; 2011b). Portanto, o consórcio ficou composto por todos os 7 isolados identificados do gênero *Pseudoalteromonas*, *Halomonas* e *Cobetia*; com os seguintes códigos M1701, M2102, M2103, A0303, A0802, AS0402, AS1101.

#### 5.4 Curva de crescimento das estirpes

Após escolhidas as estirpes das quais o consórcio seria composto, foi realizado a curva de crescimento de todas as 7 estirpes com objetivo de se conhecer o padrão de crescimento de cada uma, e determinar o tempo exato de incubação que levaria para alcançar a concentração correta de bactérias do inóculo no experimento.

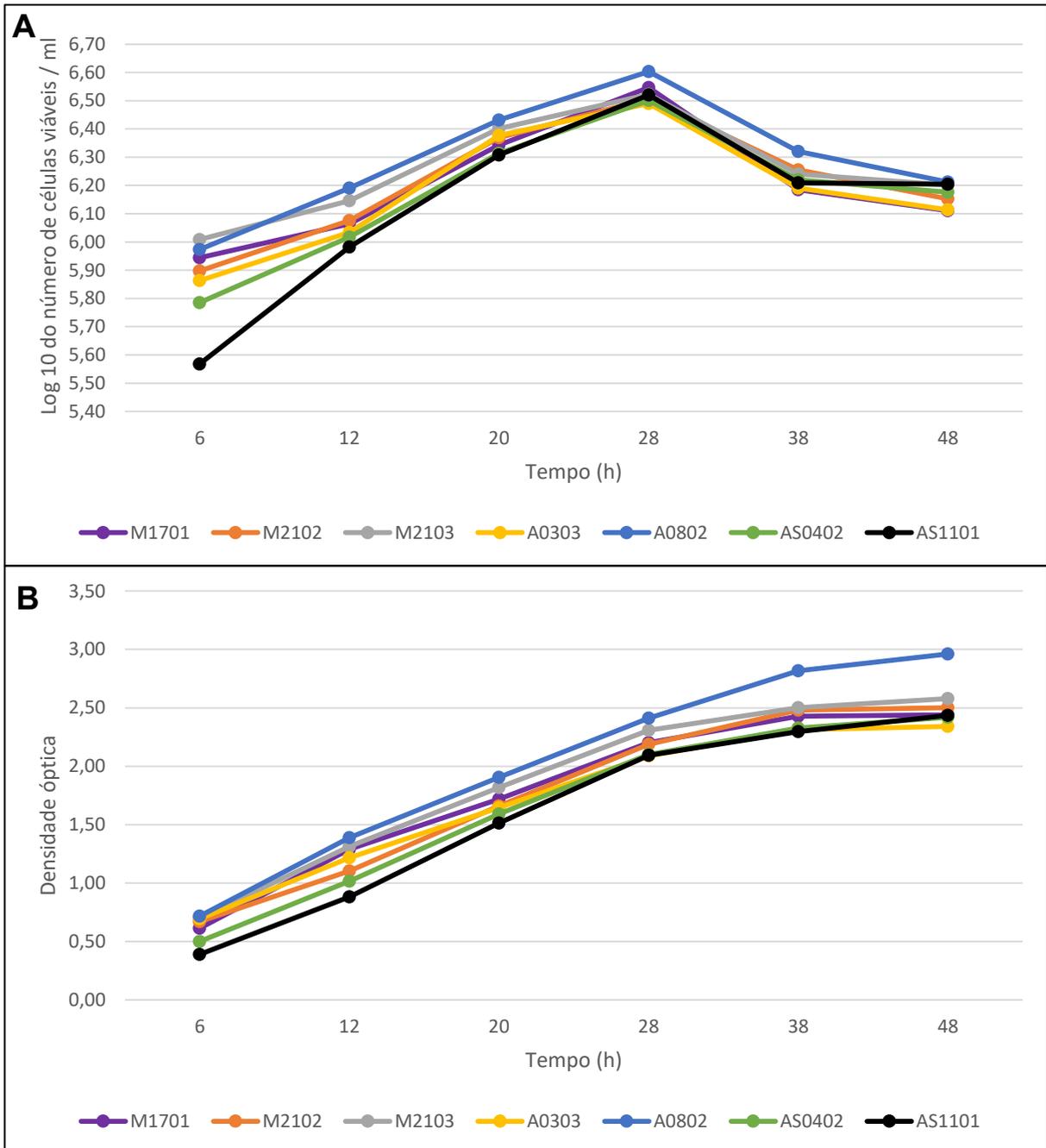
Durante o crescimento bacteriano em meio de cultura líquido, as bactérias apresentam uma curva de crescimento padrão, quando este é expresso como o logaritmo do número de bactérias ao longo do tempo, composta por quatro fases distintas: fase de arranque, fase exponencial de crescimento, fase estacionária e fase de declínio (KONEMAN et al., 2001). Na tabela 5 estão descritos os valores obtidos para densidade óptica e o número de células bacterianas viáveis existentes por ml de meio de cultura de cada estirpe, ao longo de 48 horas de incubação. Na figura 24, estão representadas as respectivas curvas de crescimento, com o número de células viáveis descrito em logaritmo na base 10.

A partir desses dados, é possível observar que as estirpes que pertencem ao gênero *Pseudoalteromonas* (M1701, M2102, M2103, A0303, A0802) possuem um crescimento mais rápido nas primeiras 6 horas comparadas com a estirpe *Halomonas taeanensis* (AS1101) e a *Cobetia marina* (AS0402). Porém, a partir do terceiro tempo de contagem de células, todas as 7 estirpes ficam com o número de células viáveis bem próximas (tabela 5). A fase de equilíbrio em todas as estirpes é atingida com 28 horas enquanto após esse tempo de crescimento, inicia-se a fase de declínio do número de células viáveis.

**Tabela 5:** Densidade óptica do meio de cultura e número de células viáveis por ml das estirpes do consórcio ao longo de 48 horas de incubação a 26 - 28°C.

Tempo (h)	Densidade Óptica* das estirpes							Número de células viáveis (UFC/ml) das estirpes						
	M1701	M2102	M2103	A0303	A0802	AS0402	AS1101	M1701	M2102	M2103	A0303	A0802	AS0402	AS1101
06	0,614	0,671	0,702	0,695	0,717	0,500	0,390	88 x 10 <sup>4</sup>	79 x 10 <sup>4</sup>	102 x 10 <sup>4</sup>	73 x 10 <sup>4</sup>	94 x 10 <sup>4</sup>	61 x 10 <sup>4</sup>	37 x 10 <sup>4</sup>
12	1.290	1.103	1.314	1.217	1.390	1.016	0.882	116 x 10 <sup>4</sup>	119 x 10 <sup>4</sup>	140 x 10 <sup>4</sup>	108 x 10 <sup>4</sup>	155 x 10 <sup>4</sup>	104 x 10 <sup>4</sup>	96 x 10 <sup>4</sup>
20	1.718	1.659	1.819	1.646	1.906	1.592	1.513	220 x 10 <sup>4</sup>	234 x 10 <sup>4</sup>	252 x 10 <sup>4</sup>	238 x 10 <sup>4</sup>	270 x 10 <sup>4</sup>	206 x 10 <sup>4</sup>	203 x 10 <sup>4</sup>
28	2.203	2.189	2.307	2.089	2.411	2.101	2.094	352 x 10 <sup>4</sup>	321 x 10 <sup>4</sup>	333 x 10 <sup>4</sup>	309 x 10 <sup>4</sup>	401 x 10 <sup>4</sup>	317 x 10 <sup>4</sup>	331 x 10 <sup>4</sup>
38	2.428	2.480	2.501	2.313	2.817	2.326	2.297	153 x 10 <sup>4</sup>	180 x 10 <sup>4</sup>	174 x 10 <sup>4</sup>	155 x 10 <sup>4</sup>	209 x 10 <sup>4</sup>	166 x 10 <sup>4</sup>	162 x 10 <sup>4</sup>
48	2.440	2.502	2.580	2.342	2.960	2.420	2.436	129 x 10 <sup>4</sup>	142 x 10 <sup>4</sup>	159 x 10 <sup>4</sup>	130 x 10 <sup>4</sup>	163 x 10 <sup>4</sup>	150 x 10 <sup>4</sup>	160 x 10 <sup>4</sup>

\*comprimento de onda de 600 nm



**Figura 24:** Curvas de crescimento das estirpes do consórcio, em função dos valores obtidos para: A, logaritmo na base 10 do número de células viáveis por ml e B, densidade óptica ao longo de 48 horas de incubação.

### 5.5 Parâmetros físico-químicos da água.

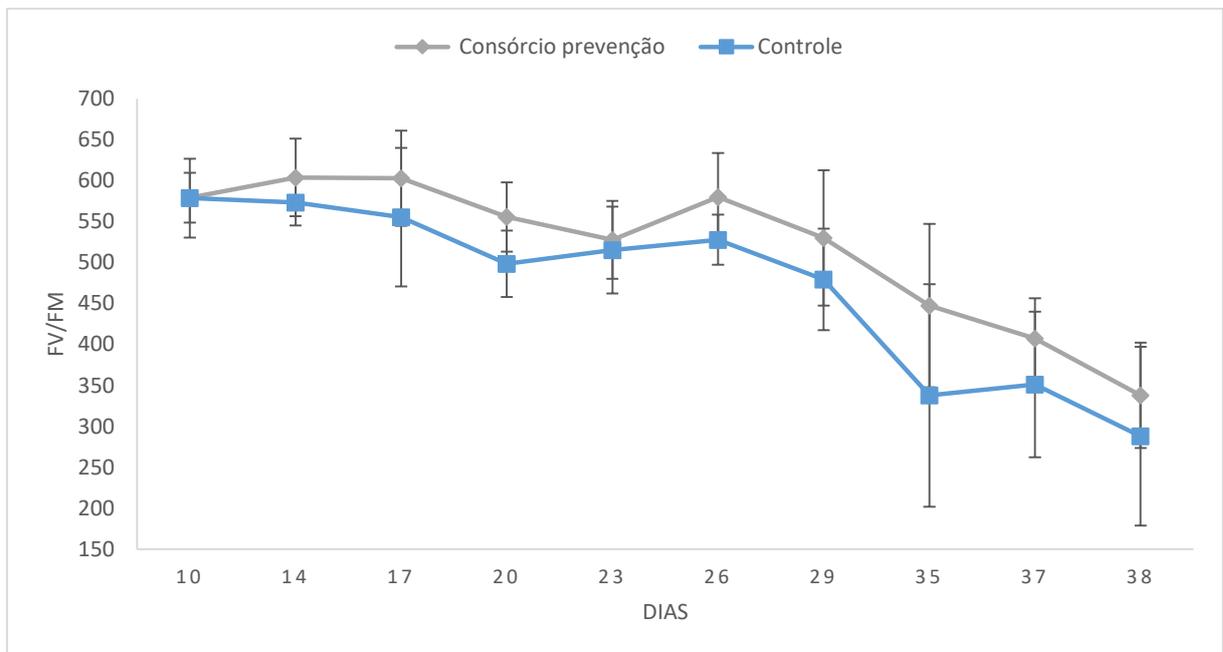
Durante todo o período de 39 dias de experimento os parâmetros de pH e de salinidade se mantiveram constantes, não sofrendo alterações significativas em nenhum tratamento em ambas temperaturas de 25 e 30°C. Os valores de pH ficaram estáveis entre 7,7 e 7,9 enquanto a salinidade entre 34,5 e 36 g/L. Portanto ambos os fatores não tiveram influência em nenhum tratamento.

No parâmetro de concentração de oxigênio dissolvido foi possível observar diferença entre os tratamentos com temperaturas diferentes. Todos os aquários mantidos na temperatura de 25°C mantiveram uma faixa de 6,20 a 6,50 ppm, enquanto os aquários mantidos em temperatura mais elevada de 30°C mantiveram a concentração de oxigênio dissolvido na faixa de 5,85 a 6,05 ppm.

## 5.6 Avaliação da saúde dos corais

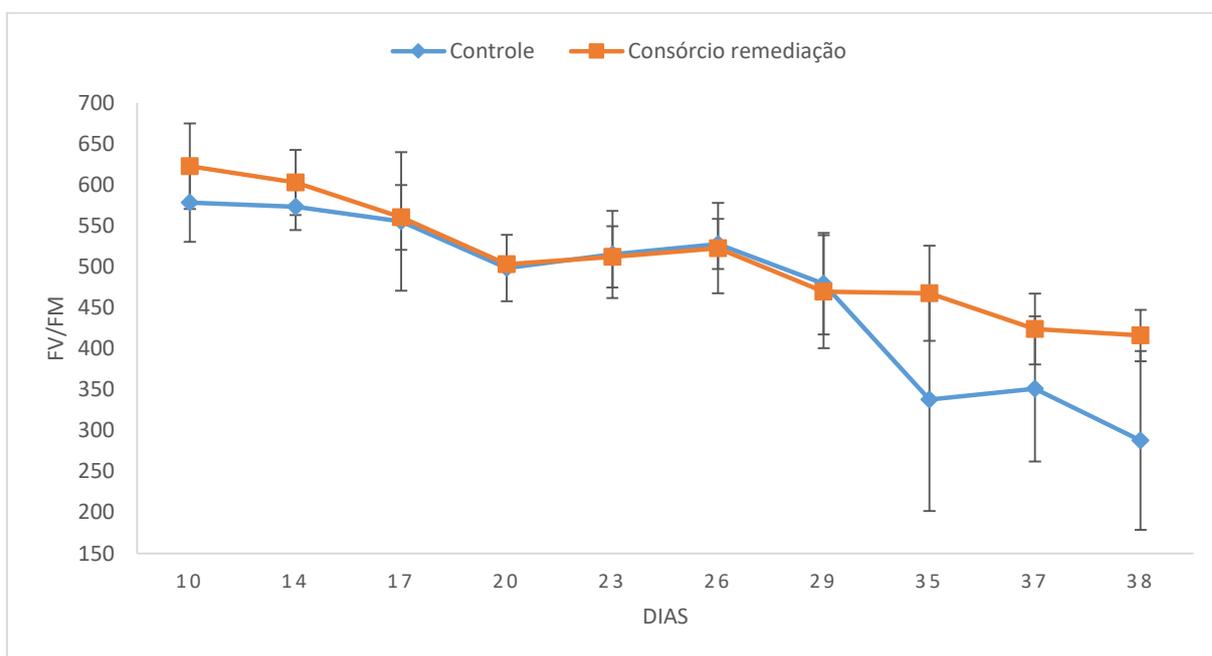
### 5.6.1 Quantificação da capacidade fotossintética das zooxantelas

A quantificação da capacidade fotossintética da zooxantelas foi determinado através dos valores de Fv/Fm. Os gráficos representados nas figuras 25 até 30 mostram a comparação dos valores de Fv/Fm entre os diferentes tratamentos na temperatura de 30°C ao longo de todo experimento. Foram escolhidos os valores de 10 dias para serem representados nos gráficos e foi possível observar uma tendência de queda dos valores de Fv/Fm ao longo do experimento em todos os tratamentos.



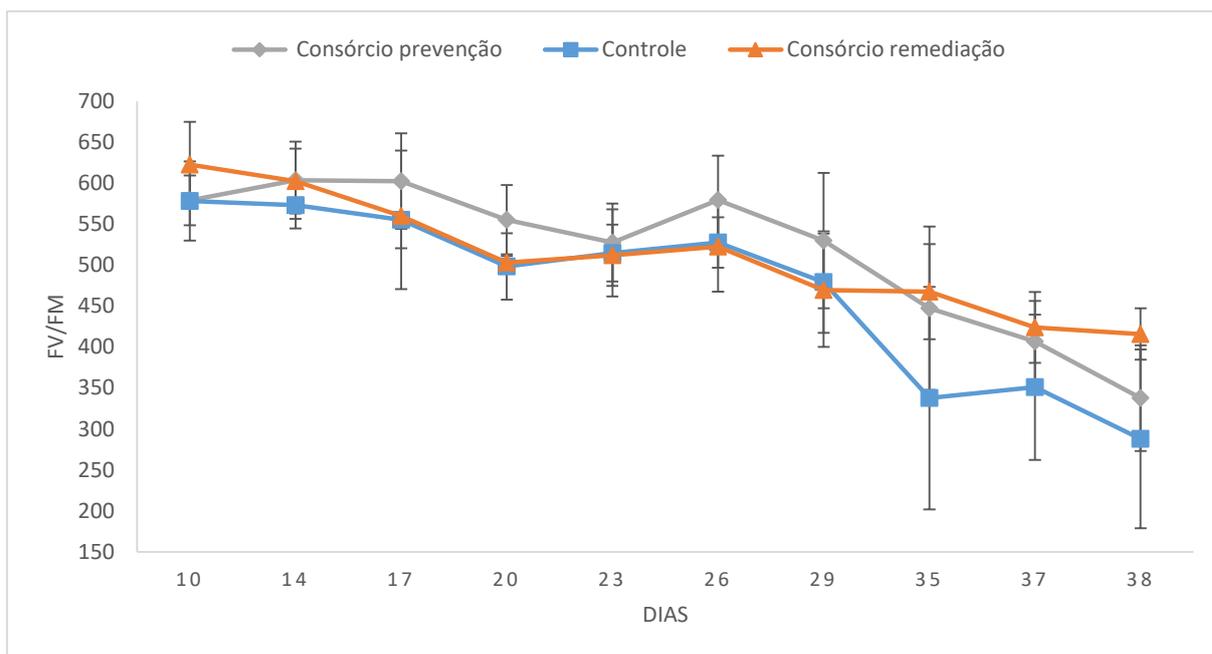
**Figura 25:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4) e controle (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.

A figura 25 representa o gráfico dos valores de Fv/Fm no experimento de estresse térmico. Com base na ANOVA fatorial é possível observar que o efeito do tratamento, ou seja, do consórcio inoculado antes do início do aumento de temperatura (consórcio prevenção) é benéfico ao coral ( $p < 0,001$ ). Em relação ao tempo, utilizando o teste de Tukey a 5% de probabilidade, não foi observado diferença estatística do dia 10 até o dia 29, porém nos últimos 3 dias houve diferença quando comparada com os primeiros dias de experimento ( $p < 0,01$ ).



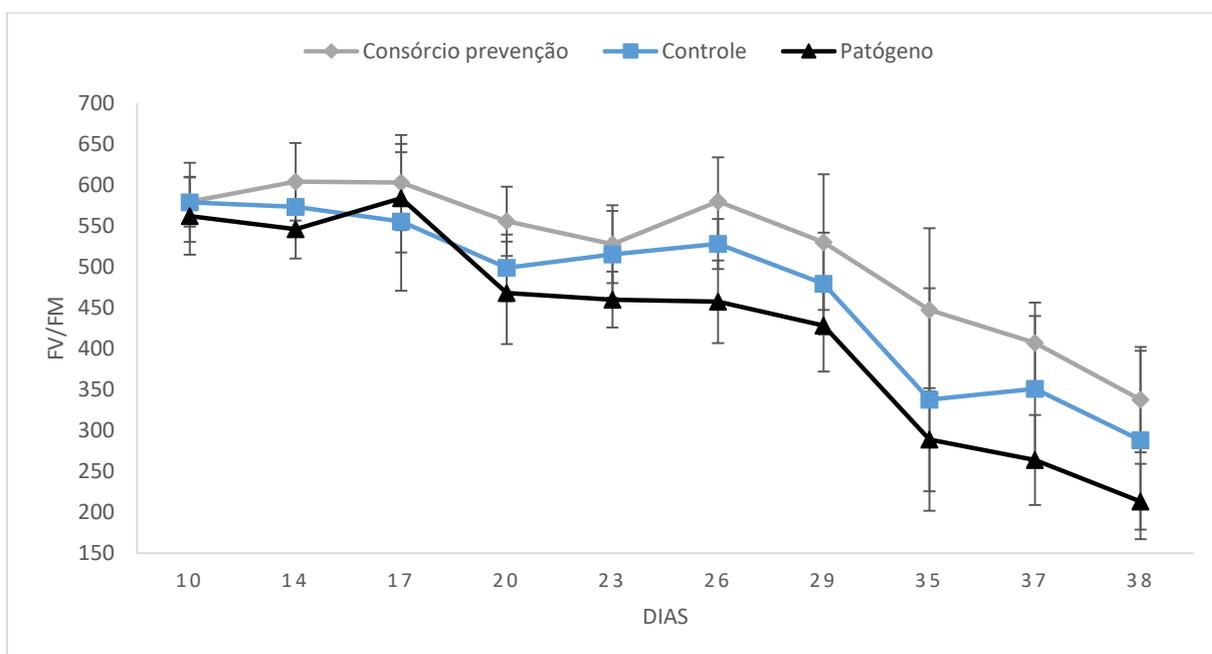
**Figura 26:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio remediação (n=4) e controle (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.

Da mesma forma que apresentado na figura 25, a figura 26 mostra a comparação apenas entre dois tratamentos, controle e consórcio remediação. Nessa comparação, também foi possível observar diferença estatística ( $p < 0,01$ ) no tratamento com inóculo do consórcio após a temperatura ter alcançado 30°C (consórcio remediação). Até o dia 29 foi observado que os valores de Fv/Fm nos dois tratamentos seguem quase que os mesmos, porém após o dia 29 começa já apresentarem diferença, e na medida tirada no dia 35 já é possível notar um efeito benéfico do consórcio sobre os corais.

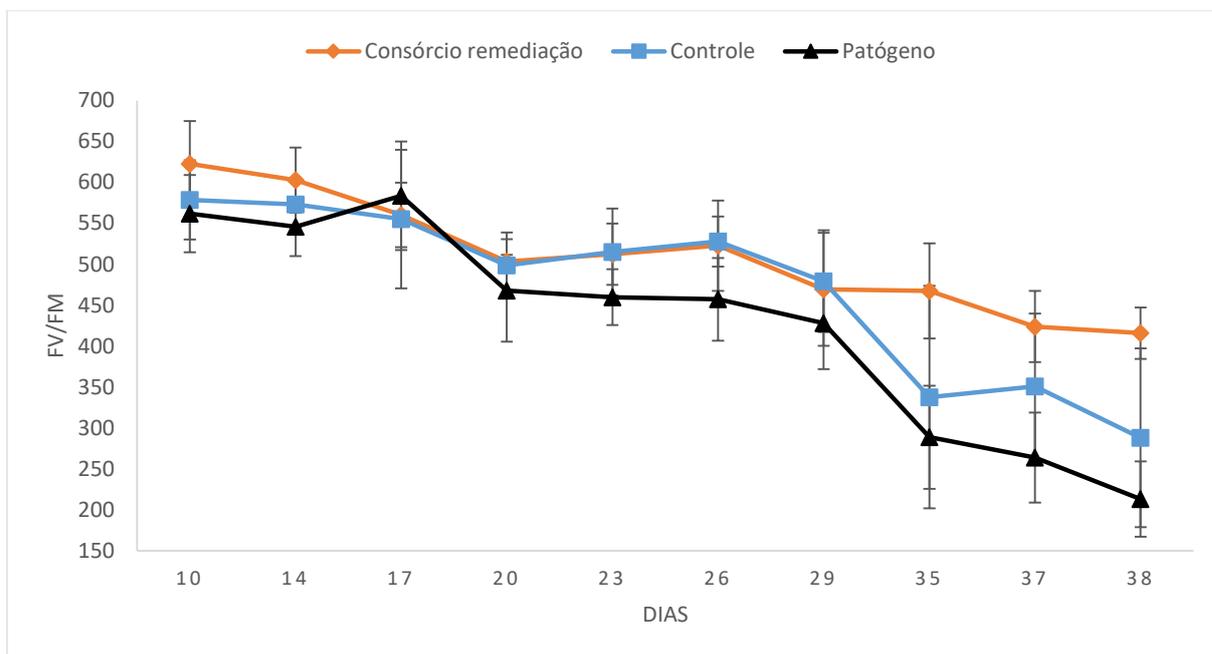


**Figura 27:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4), controle (n=4) e consórcio remediação (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.

Quando juntados os dois gráficos (figura 25 e 26) em um só, como representado na figura 27, nota-se que o efeito tratamento não apresenta diferença entre o consórcio prevenção e o remediação. Além de podermos observar que os tratamentos com consórcio sempre possuem uma média dos valores de Fv/Fm superior ao controle.



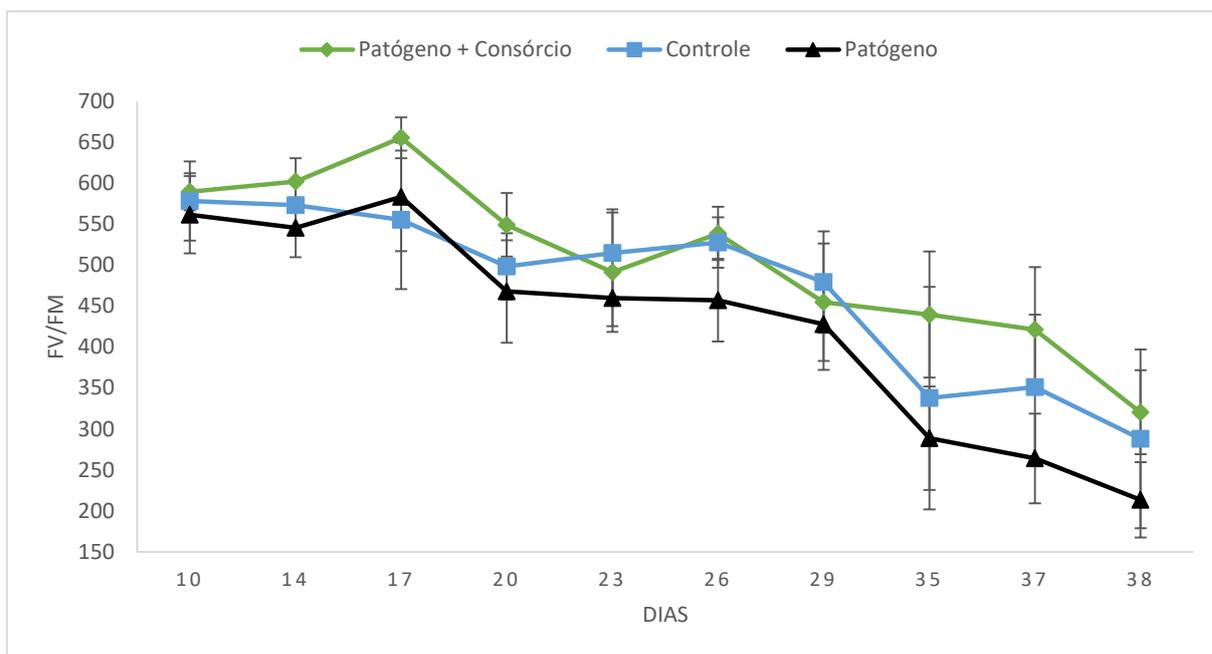
**Figura 28:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio prevenção (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.



**Figura 29:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos consórcio remediação (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.

As figuras 28 e 29 estão relacionados ao experimento envolvendo patógeno, e novamente com base na ANOVA fatorial foi possível observar um efeito significativo ( $p < 0,0001$ ) dos tratamentos. Todos tratamentos são significativamente diferentes entre si, onde o tratamento com inóculo do patógeno afeta negativamente os valores de Fv/Fm do coral *P. damicornis*, alcançando uma média de 213 no último dia de coleta.

Na figura 30, também representando o experimento envolvendo patógeno, foi possível observar pouca diferença entre os valores de Fv/Fm dos 3 tratamentos até o dia 29. Porém nas medidas realizadas no dia 35 os valores de Fv/Fm do tratamento PC difere-se dos tratamentos controle e patógeno, no qual decrescem com maior rapidez, mesmo assim, não houve diferença estatística do efeito do tratamento PC com o controle, porém quando comparado com o tratamento apenas com patógeno, o tratamento PC apresentou efeito benéfico ao coral ( $p < 0,001$ ).

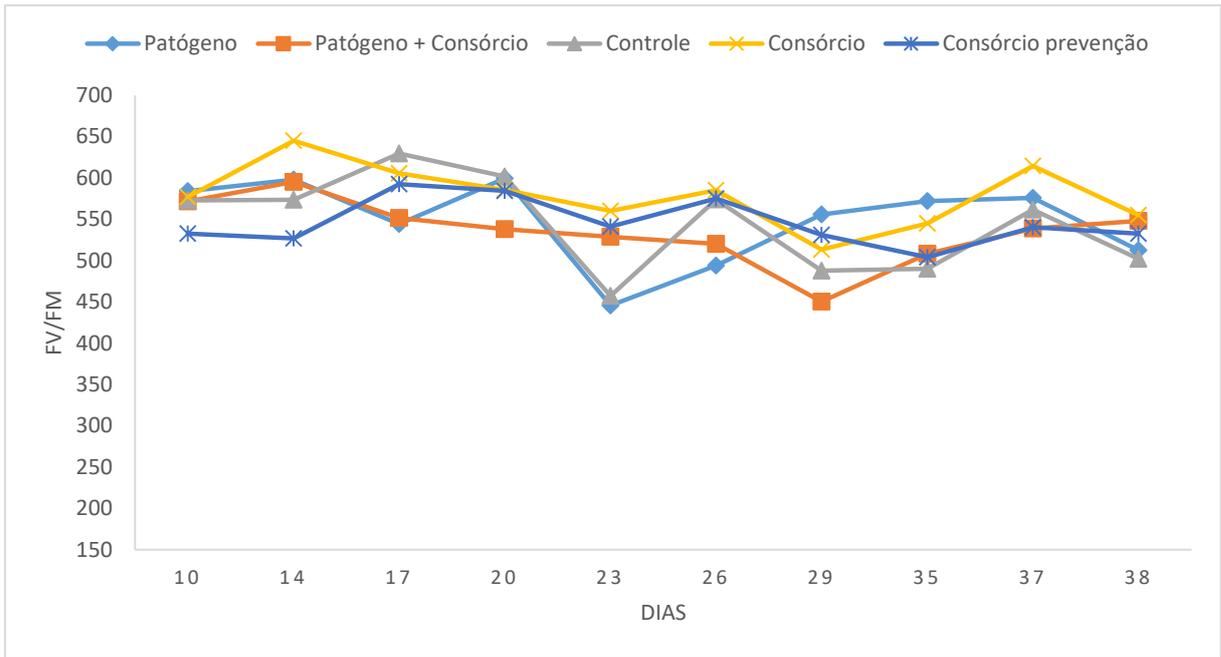


**Figura 30:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* nos tratamentos patógeno + consórcio (n=4), controle (n=4) e patógeno (n=4) a 30°C, ao longo de 28 dias.

De maneira geral, os valores de Fv/Fm em todos os tratamentos decrescem ao longo do tempo com exposição a temperatura de 30°C. Todavia, é possível observar um Fv/Fm maior nos tratamentos onde foram inoculados o consórcio quando comparados com o tratamento com apenas o patógeno. Ambos os tratamentos com apenas consórcio (Cp e Cr) e o tratamento PC não apresentaram diferença estatística entre eles, porém todos apresentam quando comparados com o tratamento P ( $p < 0,001$ ). Esses dados mostram que o efeito do consórcio existe, e traz benefício ao coral em relação as taxas de fotossíntese.

Importante notar que uma queda mais acentuada acontece a partir das medições tiradas após o dia 28 em todos os tratamentos, portanto é provável que não seja devido ao efeito tratamento e sim devido a algum fator externo.

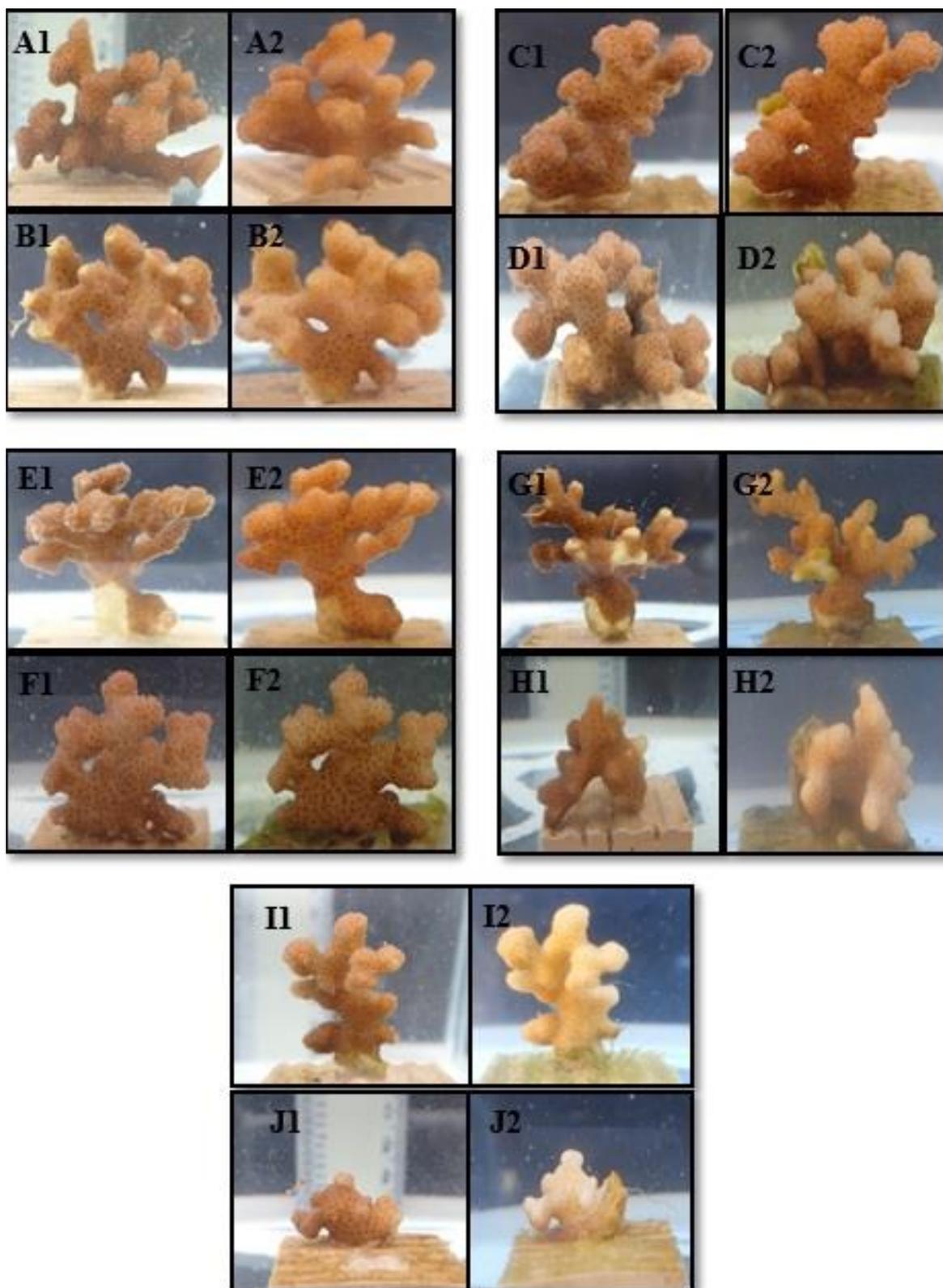
Em relação aos corais mantidos a 25°C, não houve diferença estatística no efeito de qualquer tratamento sobre os fragmentos de *P. damicornis* e nem efeito durante todo o tempo do experimento. Os valores permaneceram constantes, com poucas variações, durante todo o tempo de 28 dias como é possível observar na figura 31.



**Figura 31:** Medidas de Fv/Fm em *P. damicornis* de todos os tratamentos a 25°C, ao longo de 28 dias.

### 5.6.2 Observação morfológica do coral

Durante o experimento de manipulação dos BMCs diversas fotos foram tiradas dos fragmentos de todos os tratamentos ao longo dos dias do experimento. Essas imagens foram utilizadas para comparação do efeito morfológico no coral que os BMCs podem causar (figura 32).



**Figura 32:** Imagens comparativas dos corais *P. damicornis* no início e no fim do experimento de manipulação de microrganismos benéficos para corais na temperatura de 30°C. As imagens retratam dois fragmentos de *P. damicornis* por tratamento. Todas imagens com número 1 foram fotografadas no dia 13 do experimento e todas as imagens com número 2 foram fotografadas no dia 38 do experimento. A1 e B1: controle antes; A2 e B2: controle depois; C1 e D1: consórcio prevenção antes; C2 e D2: consórcio prevenção depois; E1 e F1: consórcio remediação antes; E2 e F2: consórcio remediação depois; G1 e H1: patógeno + consórcio antes; G2 e H2: patógeno + consórcio depois; I1 e J1: patógeno antes; I2 e J2: patógeno depois.

Nos tratamentos controles (figura 32 A e B), consórcio prevenção (figura 32 C e D) e consórcio remediação (figura 32 E e F) é possível observar que não houveram muitas variações nas cores dos fragmentos de *P. damicornis* ao longo do experimento. Importante notar que a figura 32 E, que é um fragmento pertencente ao tratamento consórcio remediação, a imagem do coral no final do experimento (E2) aparentemente está mais saudável e com uma cor mais forte quando comparada com a imagem do mesmo fragmento no início do experimento (E1).

No tratamento patógeno + consórcio, nota-se uma pequena palidez nos fragmentos, principalmente na figura 32 H, onde o fragmento no final do experimento (H2) começa a apresentar perda de coloração, conseqüentemente iniciando o processo de branqueamento quando comparado com a imagem do próprio fragmento no início do experimento (H1).

No tratamento com apenas patógeno a diferença é nítida. Tanto o fragmento da figura 32 I quanto o da figura 32 J apresentam grande perda de coloração, portanto branqueamento, nas imagens do final do experimento (I2 e J2) quando comparadas com os fragmentos saudáveis (I1 e J1) do início do experimento no qual ainda não tinham sido inoculados com o patógeno *V. coralliilyticus*.

Todas as imagens dos fragmentos de todos os tratamentos a 25°C permaneceram bem parecidas, não apresentando nenhuma diferença visível entre o fragmento no início com as imagens dos fragmentos no final do experimento.

As imagens da figura 32 mostram pouca diferença na coloração dos fragmentos dos tratamentos CTL, Cp e Cr. Por outro lado, o tratamento PC já apresentava cerca de 50% de branqueamento no penúltimo dia, corroborando com a figura 32 H2 na qual é possível observar uma maior palidez do fragmento. O tratamento com apenas patógeno (figura 32 I2 e J2), apresentou o maior percentual visual de branqueamento de todo o experimento.

## 6. DISCUSSÃO

Os microrganismos estão associados a uma grande variedade de organismos e são cada vez mais reconhecidos por desempenhar um papel importante na saúde e metabolismo do hospedeiro (LEY et al., 2008; TURNBAUGH et al., 2008). Os corais, por exemplo, são habitados por uma variedade diversa e abundante de microrganismos (SUNAGAWA et al., 2010; SHINZATO et al., 2014; BLACKALL et al., 2015) dos quais desempenham diversos papéis dentro do holobionte. Essas relações entre simbioses e hospedeiro podem ser alteradas por pressões ambientais tais como aumento da temperatura (KWIATKOWSKI et al., 2015; GUEST et al., 2016). Por conseguinte, nesse presente trabalho foi avaliado a possibilidade e a viabilidade do uso desses microrganismos que desempenham diversos papéis para a homeostase do holobionte, na montagem de um consórcio de BMCs que seja capaz de beneficiar o coral frente a tais estresses.

O consórcio de BMCs foi montado a partir de estirpes de bactérias extraídas de fragmentos do coral *Pocillopora damicornis*. Das 19 estirpes selecionadas para sequenciamento, mais da metade (63%) foram identificadas como gênero *Vibrio* (tabela 4). As espécies do gênero *víbrio* tem sido amplamente descrito como tendo um papel crucial em várias doenças de coral (VIDAL-DUPIOL et al, 2011a; 2011b), dentre as mais conhecidas tem-se o branqueamento e perda de tecido do coral *Pocillopora damicornis* pela *V. coralliilyticus* (BEN-HAIM et al., 2003b) e do coral *Oculina patagonica* pela *V. shiloi* (KUSHMARO et al., 2001).

Outro ponto importante foi o grande número de *vibrios* que apresentaram resultados positivos na amplificação do gene *nifH* (tabela 4), no qual está relacionado a fixação do nitrogênio. Esses resultados corroboram com pesquisas anteriores que demonstram que fixação de nitrogênio é um traço fenotípico comum entre espécies do gênero *víbrio*, o que justifica esse gênero ser abundante no muco de diferentes espécies de corais (CHIMETTO et al., 2008), além também de justificar a elevada porcentagem (63%) desse gênero isolado nesse estudo. A fixação de nitrogênio em corais é de grande importância para o equilíbrio homeostático do holobionte. A entrada do nitrogênio fixado nos recifes ajuda a sustentar a rede de produtividade em ambientes oligotróficos (WIEBE et al., 1975), além também, do crescimento e a

densidade de zooxantelas dentro dos corais ser altamente dependente da disponibilidade de nitrogênio (RADECKER et al., 2015), portanto, microrganismos relacionados ao ciclo do nitrogênio possuem uma vital importância na estabilidade da simbiose entre coral animal e zooxantela. Santos e colaboradores (2014) demonstraram que o aumento de temperatura é capaz de provocar alterações na comunidade de diazotróficos dentro do coral, aumentando sua abundância e diversidade, sugerindo ser uma estratégia para aumentar a resiliência do coral frente a estresses de temperatura.

Além do amplo número de estirpes sequenciadas que apresentaram resultados positivos na amplificação do gene *nifH*, outra característica importante de um BMC é a produção de catalase, na qual também foi uma característica presente na maioria das estirpes. Um resultado esperado, pelo fato de diversas bactérias apresentarem essa característica que tem como objetivo a defesa contra espécies reativas de oxigênio (IWASE et al., 2013).

Diferentemente das características mencionadas acima, o percentual de estirpes que apresentaram resultado positivo para a atividade antagonista a *V. coralliilyticus* e degradação do DMSP não foi alto, apenas uma estirpe amplificou os genes relacionados a ambas características. Em relação a degradação do DMSP, a única estirpe que amplificou o gene *dmdA* foi uma isolada da água do aquário, resultado esperado pois a maioria das espécies bacterianas que possuem esse papel são encontrados na coluna d'água (VARALJAY, 2010). O uso de uma estirpe que seja capaz de degradar DMSP é de grande importância para a eficácia do consórcio, devido principalmente a *V. coralliilyticus* utilizar o DMSP presente no coral como uma via para localização do muco da *P. damicornis* (GARREN et al., 2014), além do catabolismo de DMSP também gerar compostos antimicrobianos a base de enxofre como o ácido tropoditiético (TDA), que em baixas concentrações (0,5 µg / mL) demonstrou inibir o crescimento dos patógenos de coral como *Vibrio coralliilyticus* e *V. owensii* (RAINA et al., 2016).

Das 7 estirpes que fizeram parte da montagem do consórcio, 5 foram espécies do gênero *Pseudoalteromonas*, 1 *Halomonas taeanensis* e 1 *Cobetia marina*. Espécies do gênero *Pseudoalteromonas*, por serem bactérias copiotróficas de

crescimento rápido, são abundantes no muco do coral e na água redundante próxima aos corais (TOUT et al., 2014), devido principalmente as concentrações mais elevadas de material orgânico encontrado perto das superfícies dos corais, em comparação com as áreas abertas circundantes (WILD et al., 2004; 2010). Esse fato corrobora com nossos resultados da curva de crescimento (tabela 5 e figura 24), onde as estirpes identificadas como *Pseudoalteromonas sp.* possuíam uma taxa de crescimento superior até a hora 20 quando comparado às outras estirpes do gênero *Halomonas* e *Cobetia*.

*Pseudoalteromonas sp.* são frequentemente encontradas em abundância em corais, independentemente do estado de saúde (WILSON et al., 2012), porém existem relatos sobre espécies desempenhando papéis fundamentais para benefício do holobionte, como por exemplo, protegendo o coral contra potenciais patógenos gram-positivos (SHNIT-ORLAND et al., 2012; OFFRET et al., 2016) e através da produção de *tetrabromopyrrole* (TBP), um agente químico envolvido no assentamento e na metamorfose larval em corais (TEBBEN et al., 2011; SNEED et al., 2014). As espécies do gênero *Halomonas* são na sua maioria bactérias halófilas (SKERRATT et al., 1991), ou seja, conseguem habitar ambientes com grandes concentrações de sal. É um gênero frequentemente isolado do muco de corais saudáveis (BELENEVA et al., 2005; MEYER et al., 2015) e potenciais degradadores de ácido acrílico, possuindo um importante papel no ciclo biogeoquímico do enxofre do holobionte (RAINA et al., 2009). O gênero *Cobetia*, além de também ser frequentemente isolado do muco de corais saudáveis (SANTIAGO-VÁZQUEZ et al., 2007; BADHAI et al., 2016), já foi descrito por conter atividade de anti-incrustação (MOHAMED ALI et al., 2009), nesse caso evitando o assentamento de vermes tubulares no coral. Todas essas relações benéficas aos corais que esses três gêneros possuem, além do fato de apresentarem características importantes (tabela 4), fazem dessas estirpes potenciais candidatas a compor um consórcio de BMCs.

Escolhidas as estirpes, o próximo passo foi realizar a curva de crescimento de todas as 7 estirpes com objetivo de determinar o tempo exato de incubação que levaria para alcançar a concentração correta de bactérias do inóculo no experimento.

Foi possível observar uma queda considerável de células viáveis a partir da hora 28 em todas as estirpes. Essa queda pode ser justificada pelo esgotamento de nutrientes do meio de cultura e pelo aumento dos produtos tóxicos provenientes do próprio metabolismo bacteriano (ISCSS, 2009). Além disso, nota-se que a avaliação da densidade óptica do meio de cultura pode ser considerada um método eficaz para estimar a quantidade de células viáveis das estirpes usadas no consórcio somente até 28 horas de crescimento, ou seja, até o final da fase estacionária, já que a turbidimetria não é capaz de realizar discriminação entre as células vivas e as células mortas no meio de cultura (Tabela 5 e Figura 24). A avaliação da densidade óptica é baseada no fato de as células microbianas dispersarem a luz, podendo assim, ser detectadas, por medição da absorbância em um espectrofotômetro (ISCSS, 2009). A partir da observação dos dados descritos na figura 24, foi possível obter ao longo das primeiras 28 horas de crescimento das estirpes, a correlação existente entre a turbidez do inóculo e o número de células microbianas viáveis existentes por ml de meio de cultura.

Quanto às variações das medidas de concentração de oxigênio dissolvido nos banhos-maria, é provável que essa pequena diferença nos tratamentos entre as duas temperaturas não deva ter influenciado nenhum resultado da avaliação da saúde dos corais, pois continuam dentro dos valores considerados normais de 5 a 8 ppm em água de mar (FIORUCCI & FILHO, 2005). O fator mais importante que influencia diretamente a solubilidade de oxigênio na água é a temperatura devido a solubilidade dos gases em água diminuir com sua elevação, logo, a quantidade de oxigênio que se dissolve a 25°C é maior do que a 30°C. Além disso, outro fator que também deve ter influenciado na queda da concentração de oxigênio dissolvido foi o aumento do metabolismo, conseqüentemente da respiração celular (FIORUCCI & FILHO, 2005), dos microrganismos presentes dentro dos aquários a temperatura de 30°C.

Após o consórcio crescido, toda estrutura do mesocosmo construída e os corais fragmentos e adaptados às condições utilizadas durante o experimento (temperatura de 25°C, intensidade luminosa e todos os parâmetros físico – químicos de pH, salinidade e oxigênio dissolvido da água salina artificial) foi possível dar início ao experimento de inoculação do consórcio BMCs. O potencial de se estudar microrganismos cultiváveis mutualistas de corais e os seus mecanismos de interação

já foi citado anteriormente em diversos estudos como sendo um tratamento viável e plausível para tentar salvar os recifes de coral (SHNIT-ORLAND & KUSHMARO, 2009; KREDIET et al., 2013). Porém o grande número de pesquisas focando em análises de comunidade bacterianas não cultiváveis e a falta de material científico propondo o uso de microrganismos com determinadas características que sejam benéficas ao holobionte, fez com que estudos sobre microrganismos cultiváveis se tornassem menores, com baixa relevância no atual cenário científico.

Estudos de manipulação de microbiota tem focado principalmente em hospedeiros terrestres (ALIVISATOS et al., 2015), como por exemplo no controle biológico e inoculação de PGPR na agricultura (BERG 2009), transplante fecal (VAN NOOD et al., 2013) e uso de probióticos em humano (LEITE et al., 2013; 2015). Seguindo esse pensamento, nosso grupo propôs a manipulação de microrganismos também em organismos marinhos, através do uso dos BMCs.

Dessa forma, essa pesquisa está sendo inédita no que diz respeito a manipulação de microrganismos em corais, e como foi possível observar nos gráficos 25 a 30 e na figura 32, a inoculação do BMCs causa benefício significativo sobre os corais.

Todos os tratamentos se iniciam com os corais na faixa do Fv/Fm em 600, mostrando que todos os fragmentos de todos os corais começaram com o mesmo grau de saúde. Até o dia 26, ou seja, 8 dias após o inóculo do consórcio e 7 dias do inóculo do patógeno não houve alteração significativa na taxa de fotossíntese das zooxantelas. Por outro lado, a partir do dia 29 foi possível observar uma queda de Fv/Fm de todos os tratamentos, principalmente do controle e do patógeno, enquanto os tratamentos com consórcio (Cp, Cr e PC) tiveram uma queda menos expressiva. Esses dados corroboram com pesquisas anteriores onde foi possível observar início da virulência da *V. coralliilyticus* apenas após 10 a 12 dias de inoculação sobre os corais (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2004). Portanto, entre os dias 29 e 35 começaram a aparecer os primeiros sinais da virulência do patógeno.

O processo de branqueamento de corais é um dos fenômenos ecológicos em resposta ao estresse decorrente de perturbações ambientais. Uma série de fatores,

como variações de salinidade, sedimentação excessiva e poluição, entre outros, pode ocasionar esse fenômeno (BROWN, 1997; ZANEVELD et al., 2016). No entanto, a ocorrência de branqueamento em larga escala na natureza está geralmente associada a temperaturas elevadas combinadas com alta incidência de luz (HUGHES et al., 2003; BRUNO et al., 2007).

Nossos resultados demonstraram que a utilização de BMCs é uma tecnologia promissora. Todos os fragmentos de corais que foram tratados com inóculo de consórcio, seja consórcio prevenção, remediação ou no tratamento patógeno + consórcio, obtiveram significativamente o Fv/Fm superior aos tratamento controle e patógeno. A temperatura do mar 1-2°C acima do aumento médio que ocorre no verão aumentam o excesso de energia de excitação associado à fotoinibição durante a fotossíntese, causando a desintegração e a expulsão de zooxantelas e consequentemente o branqueamento (ENRIQUEZ et al., 2005). No nosso experimento utilizamos temperaturas de 30°C, uma temperatura elevada e incomum de se encontrar nos mares e mesmo assim, o consórcio de BMCs foi capaz de minimizar os danos causados pelo estresse de temperatura, juntamente com o estresse de introdução de patógeno, que na temperatura de 30°C a *V. coralliilyticus* expressa genes que aumentam sua patogenicidade (BEN-HAIM et al., 2003b; KIMES et al., 2012).

A falta de preparo ou tecnologia que previna os danos aos corais caso ocorra novamente um aumento exacerbado da temperatura e consequentemente um branqueamento é uma das questões mais preocupantes e debatidas atualmente entre os cientistas. Um dos possíveis mecanismos de uso dos BMCs seria, por exemplo, em um futuro alerta de branqueamento pela NOAA (*National Oceanic and Atmospheric Administration*), portanto, a inoculação desses microrganismos seria efetivada antes de um evento de branqueamento.

Em todos os tratamentos a 25°C não houveram efeito algum do patógeno e/ou do consórcio nos valores de Fv/Fm e nem visualmente da morfologia dos fragmentos. Embora um estudo prévio tenha demonstrado branqueamento da *P. damicornis* pela *V. coralliilyticus* a essa temperatura (BEN-HAIM & ROSENBERG, 2004), nossos dados não mostram esse efeito nessas condições, corroborando com outro estudo

mais recente realizado também com esse coral e com o mesmo patógeno onde também não foi possível notar efeito de branqueamento em tal temperatura (VIDAL-DUPIOL et al., 2011). Vidal-Dupiol e colaboradores sugerem que esse efeito não foi notado possivelmente devido ao coral utilizado ser diferente geneticamente e que então os corais utilizados por eles no experimento teriam maior resistência a temperaturas mais baixas como de 25°C. É possível que talvez isso também tenha ocorrido com os corais nesse projeto, portanto, sendo resistentes à *víbrio* em temperaturas próximas a 25°C.

A manipulação de BMCs se mostrou eficaz quanto ao objetivo de melhorar a saúde dos corais frente ao estresse de temperatura e de presença de patógeno. Essa manipulação pode também ser utilizada em conjunto com outras técnicas para melhores resultados, como por exemplo, a evolução humana assistida. Essa técnica envolve o melhoramento genético de corais para aumentar sua resistência a estresses naturais e antropogênicos acelerando naturalmente a adaptação do coral contra esses ambientes hostis, tais como mutações aleatórias, seleção natural, aclimatização e mudanças nas comunidades de simbioses (VAN OPPEN et al., 2015).

Visando as crescentes ameaças aos recifes de corais, o uso dos BMCs como uma “terapia microbiana” de coral é uma área potencialmente nova de estudo diante das crescentes ameaças aos recifes de corais que podem ter resultados positivos para recifes no futuro próximo.

## 7. Conclusão

- É possível isolar microrganismos do próprio coral que possuem características que tragam benefícios aos corais, tais como: papel no ciclo do nitrogênio (fixação do nitrogênio e/ou desnitrificação), ser catalase positivo e apresentar atividade de degradação do DMSP.
- A presença de *Vibrio sp.* é alta no coral, mesmo ele em um estado saudável.
- As bactérias mutualistas isoladas de *Pocillopora damicornis* não apresentaram atividade antagonista contra o patógenos *Vibrio coralliilyticus* e atividade de degradação de DMSP.
- A manipulação de microrganismos benéficos para corais é viável. O primeiro consórcio BMC já testado apresentou efeito benéfico e de proteção do coral *Pocillopora damicornis* em ambos os experimentos, de aumento de temperatura e presença do patógeno *Vibrio coralliilyticus* a 30°C.
- Não houve mudanças no estado de saúde dos fragmentos dos corais entre os tratamentos a 25°C.
- Mais estudos visando melhorar a utilização dos BMCs em aquários e/ou em ambientes naturais são necessários. Melhoras como concentração de células no inóculo e número de aplicações do inóculos necessários ao longo do tempo.

## 8. REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. Reefing like it's 1999: How reef aquarium flow and lighting has changed over the past decade. **Advanced Aquarist Online Magazine**. <http://www.advancedaquarist.com/2010/1/review2>, 2010.
- AGOSTINI, S.; SUZUKI, Y.; HIGUCHI, T.; CASARETO, B. E.; YOSHINAGA, K.; NAKANO, Y.; et al. Biological and chemical characteristics of the coral gastric cavity. **Coral Reefs**, 31, 147–156. doi:10.1007/s00338-011-0831-6, 2012.
- AINSWORTH, T. D.; FINE, M.; ROFF, G.; HOEGH-GULDBERG, O. Bacteria are not the primary cause of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagonica*. **ISME J** 2, 67–73. doi:10.1038/ismej.2007.88, 2008.
- AINSWORTH, T. D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of corals reefs: a microbial perspective. Review, **Trends in Ecology and Evolution**, 25 (4), 233-240, 2009.
- ALAGELY, A.; KREDIET, C. J.; RITCHIE, K. B.; TEPLITSKI, M. Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. **ISME J**. 5, 1609–1620, 2011.
- ALEJANDRO, A. S.; ARAVIND, L.; MADEEN, T. L.; SHAVIRIN, S.; SPOUGE, Y. I.; WOLF, E. V. K.; ALTSCHUL, S. F. Improving the accuracy of PSI-BLAST protein database searches with composition-based statistics and other refinements. **Nuclei Acids Res.**, 29 (14), 2994-3005, 2001.
- ALIVISATOS, A. P.; BLASER, M. J.; BRODIE, E. L.; CHUN, M.; DANGL, J. L.; DONOHUE, T. J.; et al. Unified Initiative to Harness the Earth's Microbiomes. **Science**, 350, 507–508, 2015.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W. and LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, 25, 3389-3402, 1997.
- ALVES, N.; NETO, O. S.M.; SILVA, B. S. O.; DE MOURA, R. L.; FRANCINI FILHO, R. B.; CASTRO, C. B et al. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos Bank corals. **Env. Micro. Rep.**, 2, 90–95, 2010.
- ATAD, I.; EFRONY, R.; ROSENBERG, E. Phage therapy of coral white plague disease: properties of phage BA 3. **Curr. Micro.**, 58 (2) 139-45, 2009.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.; SUTHERLAND, R.; THOMPSON, F. L.; SWINGS, J. Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia nauplii*. **Env. Micro.**, 7, 1488–1495, 2005.
- BADHAI, J.; GHOSH, T. S.; DAS, S. K. Composition and Functional Characterization of Microbiome Associated with Mucus of the Coral *Fungia echinata* Collected from Andaman Sea. **Front. Micro.**, 7, 936. doi:10.3389/fmicb.2016.00936, 2016.

BAROTT, K. L.; & ROHWER, F. L. Unseen players shape benthic competition on coral reefs. **Trends Micro.**, 20, 621–628. doi:10.1016/j.tim.2012.08.004, 2012.

BAZILCHUK, N. A new cash crop for the aquarium trade protects Fiji's reefs. <http://www.conservationmagazine.org/2008/07/live-rock/>. Accessed 21 December 2013, 2008.

BEDNARZ V. N.; VAN HOYTEMA, N.; CARDINI, U.; NAUMANN, M. S.; AL-RSHADAT, M. M. D.; WILD, C. Dinitrogen fixation and primary productivity by carbonate and silicate reef sand communities of the Northern Red Sea. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 527, 47–57. doi:10.3354/meps11224, 2015.

BELENEVA, I. A.; DAUTOVA, T. I.; ZHUKOVA, N. V. Characterization of communities of heterotrophic bacteria associated with healthy and diseased corals in Nha Trang Bay (Vietnam). **Microbiology**, 74, 579–587, 2005.

BEN-HAIM, Y. and ROSENBERG, E. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Marine Biology**, 141, 47–55, 2002.

BEN-HAIM, Y. and ROSENBERG, E. Temperature-Regulated bleaching and tissue lysis of *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Coral Health and Disease**, 301-324, 2004.

BEN-HAIM, Y.; THOMPSON, F. L.; THOMPSON, C. C.; CNOCKAERT, M. C.; HOSTE, B.; SWINGS, J.; et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Inter. J. Syst. Evol. Micro.**, 53, 309–315, 2003a.

BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral *Pocillopora damicornis* by the Novel Pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **App. and Env. Micro.**, 69(7), 4236–4242, 2003b.

BERG, G. Plant–microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. **Appl. Micro. Biotechnol.**, 84, 11–18, 2009.

BHATTACHARYA, D.; AGRAWAL, S.; ARANDA, M.; BAUMGARTEN, S.; BELCAID, M.; DRAKE, J. L., ET AL. Comparative genomics explains the evolutionary success of reef-forming corals. **Elife**, 5, doi: 10.7554/eLife.13288, 2016.

BLACKALL, L. L.; WILSON, B.; VAN OPPEN, M. J. H. Coral—the world's most diverse symbiotic ecosystem. **Mol. Ecol.**, 24, 5330–5347, 2015.

BOURNE, D.; GARREN, M.; WORK, T. M.; ROSENBERG, E.; SMITH, G. W.; HARVELL, C. D. Microbial disease and the coral holobiont. **Trends Micro.**, 17, 554–562. doi:10.1016/j.tim.2009.09.004, 2009.

BOURNE, D.; IIDA, Y.; UTHICKE, S.; SMITH-KEUNE, C. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **ISME J.**, 2, 350–363. doi:10.1038/ismej.2007.112, 2008.

- BOWDEN-KERBY, A. Low-tech coral reef restoration methods modelled after natural fragmentation processes. **Bulletin of Marine Science**, 69, 915–931, 2001.
- BRANDT, M. E. and MCMANUS, J. W. Disease incidence is related to bleaching extent in reef-building corals. **Ecology**, 90: 2859–2867, 2009.
- BROWN, B. E. Coral bleaching: Causes and consequences. **Coral Reefs**, 16, 129–138, 1997.
- BROWN, B. E., and BYTHELL, J. C. Perspectives on mucus secretion in reef corals. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 296, 291–309. doi: 10.3354/meps296291, 2005.
- BRUNO J. F., et al. Thermal stress and coral cover as drivers of coral disease outbreaks. **PLoS Biol.**, 5, 1220–1227, 2007.
- BRUNO, J. F.; PETES, L. E.; HARVELL, C. D.; HETTINGER, A. Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. **Ecol. Lett.**, 6, 1056–1061. doi:10.1046/j.1461-0248.2003.00544.x, 2003.
- BURGE, C. A.; MARK EAKIN, C.; FRIEDMAN, C. S.; FROELICH, B.; HERSHBERGER, P. K.; HOFMANN, E. E.; et al. Climate change influences on marine infectious diseases: implications for management and society. **Ann. Rev. Mar. Sci.**, 6, 249–277. doi:10.1146/annurev-marine-010213-135029, 2014.
- BURRIESCI, M. S.; RAAB, T. K.; PRINGLE, J. R. Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. **J. Exp. Biol.**, 215, 3467–3477. doi:10.1242/jeb.070946, 2012.
- CARDINI, U. et al. Benthic N<sub>2</sub> fixation in coral reefs and the potential effects of human-induced environmental change. **Ecol. Evol.**, 4, 1706–1727, 2014.
- CAUSEY, B. Coral reefs of the U.S. and Caribbean: the history of massive coral bleaching and other perturbations in the Florida Keys. In: CW, DS, eds. Status of Caribbean coral reefs after bleaching and hurricanes in 2005. Townsville, Australia: Global Coral Reef Monitoring Network, and Reef and Rainforest Research Centre. 61–72, 2008.
- CEH, J.; RAINA, J. B.; SOO, R. M.; VAN KEULEN, M.; BOURNE, D. G. Coral- bacterial communities before and after a coralmass spawning event on ningaloo reef. **PLoS ONE**, 7, e36920. doi: 10.1371/journal.pone.0036920, 2012.
- CERTNER, R. H.; VOLLMER, S. V. Evidence for Autoinduction and Quorum Sensing in White Band Disease-Causing Microbes on *Acropora cervicornis*. **Sci. Rep.**, 5, doi:10.1038/srep11134, 2015.
- CHIMETTO, L. A.; BROCCHI, M.; THOMPSON, C. C.; MARTINS, R. C. R.; RAMOS, H. R., et al. *Vibrios* dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Syst. Appl. Micro.**, 31, 312–319, 2008.

COHEN, Y.; JOSEPH POLLOCK, F.; ROSENBERG, E.; BOURNE, D. G. Phage therapy treatment of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Micro. Open**, 12, 2013.

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; GROOT, R.; FARBERK, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, 387, 1997.

DAVY, S. K.; ALLEMAND, D.; WEIS, V. M. Cell biology of cnidarian- dinoflagellate symbiosis. **Micro. Mol. Biol. Rev.**, 76, 229–261. <http://dx.doi.org/10.1128/MMBR.05014-11>, 2012.

DAVY, S. K.; BURCHETT, S. G.; DALE, A. L.; DAVIES, P.; DAVY, J. E.; MUNCKE, C., et al. Viruses: Agents of coral disease? **Dis. Aquat. Organ.**, 69, 101–110. doi:10.3354/dao069101, 2006.

DE OLIVEIRA SANTOS, E.; ALVES, J. R. N.; DIAS, G. M.; MAZOTTO, A. M.; VERMELHO, A.; VORA, G. J.; et al. Genomic and proteomic analyses of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* reveal a diverse virulence repertoire. **ISME J.**, 5, 1471–1483, 2011.

DENNER, E. B. M.; SMITH, G. W.; BUSSE, H. J.; SCHUMANN, P.; NARZT, T.; POLSON, S. W.; et al. *Aurantimonas coralicida* gen. nov., sp. nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. **Inter. J. of Syst. and Evol. Micro.**, 53, 1115–1122, 2003.

DEY, V. K. Ornamental fish trade – recent trends in Asia. In: **Souvenir, ornamentals Kerala. Department of Fisheries**, Government of Kerala. 39–45, 2010.

DOBRETISOV, S.; ABED, R. M. M.; TEPLITSKI, M. Mini-review: Inhibition of biofouling by marine microorganisms. **Biofouling**, 29, 423–441. doi:10.1080/08927014.2013.776042, 2013.

DOMART-COULON, I. J.; SINCLAIR, C. S.; HILL, R. T.; TAMBUTTÉ, S.; PUVEREL, S.; OSTRANDER, G. K. A basidiomycete isolated from the skeleton of *Pocillopora damicornis* (Scleractinia) selectively stimulates short-term survival of coral skeletogenic cells. **Mar. Biol.**, 144, 583–592. doi:10.1007/s00227-003-1227-0, 2004.

DONEY, S. C.; RUCKELSHAUS, M.; EMMETT DUFFY, J.; BARRY, J. P.; CHAN, F.; ENGLISH, C. A., ET AL. Climate Change Impacts on Marine Ecosystems. **Ann. Rev. Mar. Sci.**, 4, 11–37. doi:10.1146/annurev-marine-041911-111611, 2012.

DUARTE, G.; CALDERON, E. N.; PEREIRA, C. M.; MARANGONI, L. F. B.; SANTOS, H. F.; PEIXOTO, R. S.; et al. A novel marine mesocosmo facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. **Ecology and Evolution**, doi: 10.1002/ece3.1670, 2015.

DUCKLOW, H. W. AND MITCHELL, R. Composition of mucus released by coral reef coelenterates. **Limnol. Oceanogr.**, 24(4), 706-714, 1979.

DUNLAP, W. C.; & SHICK, J. M. Ultraviolet Radiation-Absorbing Mycosporine-Like

Amino Acids in Coral Reef Organisms: a Biochemical and Environmental Perspective. **J. Phycol.**, 34, 418–430. doi:10.1046/j.1529-8817.1998.340418.x, 1998.

EFRONY, R.; LOYA, Y.; BACHARACH, E.; ROSENBERG, E. Phage therapy of coral disease. **Coral Reefs**, 26, 7-13, 2007.

ENRIQUEZ, S.; MENDEZ, E. R.; IGLESIAS-PRIETO, R. Multiple scattering on coral skeletons enhances light absorption by symbiotic algae. **Limnol. Oceanogr.**, 50, 1025–1032, 2005.

ERFTEMEIJER, L, A.; RIEGL, B.; HOEKSEMA, B.; TODD, P. Environmental impacts of dredging and other sediment disturbances on corals: A review. **Mar. Poll. Bull.**, 64, 1737-1765, 2012.

FIORUCCI, A.; FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em ecossistemas aquáticos. **Química e Sociedade**, 22, 2005.

FRIAS-LOPEZ, J.; KLAUS, J.; BONHEYO, G.; FOUKE, B. Bacterial Community Associated with Black Band Disease in Corals. **App. and Env. Micro.**, 70(10), 5955-5962, 2004.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **J. Appl. Bacteriol.**, 66, 365–378. doi:10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x, 1989.

GARREN, M., AND AZAM, F. Corals shed bacteria as a potential mechanism of resilience to organic matter enrichment. **Isme J.**, 6, 1159–1165. doi: 10.1038/ismej.2011.180, 2012.

GARREN, M.; SON, K.; RAINA, J. B.; RUSCONI, R.; MENOLASCINA, F.; SHAPIRO, O. H.; et al. A bacterial pathogen uses dimethylsulfoniopropionate as a cue to target heat-stressed corals. **ISME J.**, 8, 999–1007, 2014.

GARREN, M.; SON, K.; TOUT, J.; SEYMOUR, J. R.; STOCKER, R. Temperature-induced behavioral switches in a bacterial coral pathogen. **ISME J.**, doi:10.1038/ismej.2015.216, 2015.

GASPARINI, J. L.; FLOETER, S. R.; FERREIRA, C. E. L.; SAZIMA, I. Marine Ornamental Trade in Brazil. **Bio. and Cons.**, 14, 2883–2899, 2005.

GIAMBIAGI-DEMARVAL, M.; MAFRA, M. A.; PENIDO, E. G. C.; BASTOS, M. C. F. Distinct groups of plasmids correlated with bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. **J. Gen. Microbiol.**, 136, 1591-1599, 1990.

GLASL, B.; HERNDL, G. J.; FRADE, P. R. The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. **Isme J.**, 1–13. doi:10.1038/ismej.2016.9, 2016.

GOCHFELD, D. J.; AEBY, G. S. Antibacterial chemical defenses in Hawaiian corals provide possible protection from disease. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 362, 119–128. doi:10.3354/meps07418, 2008.

GRAHAM, N. and NASH, K. The importance of structural complexity in coral reef ecosystems. **Coral Reefs**, 32, 315– 326, 2013.

GRATZEK, J. B. and MATTHEWS, J. R. Aquariology: The Science of fish health management – Master Volume. **Tetra Pr. Hardcover**, 1994.

GUEST, J. R.; BAIRD, A. H.; MAYNARD, J. A.; MUTTAQIN, E.; EDWARDS, A. J.; CAMPBELL, S. J.; et al. Contrasting patterns of coral bleaching susceptibility in 2010 suggest an adaptive response to thermal stress. **PLoS ONE**, 7 (3), e33353, 2012.

GUEST, J. R., LOW, J., TUN, K., WILSON, B., NG, C., RAINGEARD, D., ET AL. Coral community response to bleaching on a highly disturbed reef. **Sci. Rep.**, 6. doi:10.1038/srep20717, 2016.

HALLIN, S. and LINDGREN, P. PCR Detection of Genes Encoding Nitrite Reductase in Denitrifying Bacteria. **App. Envir. micro.**, 65(4), 1652-1657, 1999.

HALPERN, B. S.; LONGO, C.; HARDY, D.; MCLEOD, K. L.; SAMHOURI, J. F.; KATONA, S. K.; et al. An index to assess the health and benefits of the global ocean. **Nature**, 488, 615–620, 2012.

HARVELL, D.; ARONSON, N. R.; BARON, J.; CONNELL, A.; DOBSON, S.; ELLNER, L.; et al. The rising tide of ocean diseases: Unsolved problems and research priorities. **Frontiers in Ecology**, 2(7), 375–382, 2004.

HARVELL, D.; JORDÁN-DAHLGREN, E.; MERKEL, S.; ROSENBERG, E.; RAYMUNDO, L.; SMITH, G.; et al. Coral Disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. **Oceanography**, 20, 172–195, 2007.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi* Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. **J. Bacteriol.**, 186, 6902–6914. doi:10.1128/JB.186.20.6902, 2004.

HENTSCHEL, U.; SCHMID, M.; WAGNER, M.; FIESELER, L.; GERNERT, C.; HACKER, J. Isolation and phylogenetic analysis of bacteria with antimicrobial activities from the Mediterranean sponges *Aplysina aerophoba* and *Aplysina cavernicola*. **FEMS Micro. Ecol.**, 35, 305–312, 2001.

Heyward, A. J.; Negri, A. P. Plasticity of larval pre-competency in response to temperature: Observations on multiple broadcast spawning coral species. **Coral Reefs**, 29, 631–636. doi:10.1007/s00338-009-0578-5, 2010.

HICKS, C. C., T. R. MCCLANAHAN, J. E. CINNER, AND J. M. HILLS. Trade-offs in values assigned to ecological goods and services associated with different coral reef management strategies. **Ecology and Society**, 14(1), 10, 2009.

HOEKSEMA, B.W.; ROGERS, A.; QUIBILAN, M.C. *Pocillopora damicornis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2014: e.T133222A54216898. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2014-1.RLTS.T133222A54216898.en>, 2014.

HOWARD, E. C.; J. R. HENRIKSEN, A.; BUCHAN, C. R.; REISCH, H.; BUERGMANN, et al. Bacterial taxa that limit sulfur flux from the ocean. **Science**, 314, 649–652, 2006.

HUDSON, H. Firstaid formassive corals infectedwith blackband disease: an underwater aspirator and post-treatment sealant to curtail re-infection. In Diving for Science in the 21st Century (Hallock,P.and French, L., eds), 10–11, **American Academy of Underwater Sciences**, 2000.

HUGHES, T., and 17 co-authors. Climate change, human impacts and the resilience of coral reefs. **Science**, 301, 929, 2003.

IWASE, T.; TAJIMA, A.; SUGIMOTO, S.; OKUDA, K.; HIRONAKA, I.; KAMATA, Y.; TAKADA, K.; MIZUNOE, Y. A simple assay for measuring catalase activity: a visual approach. **Sci. Rep.**, 3, 3081, 2013.

JEFFRIES, V. E. Three *Vibrio* strains pathogenic to larvae of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. **Aquaculture**, 29, 201–226, 1982.

JENSEN, M.A. *et al.* Modeling the role of bacteriophage in the control of cholera outbreaks. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, 103, 4652– 4657, 2006.

JONES, A M., BERKELMANS, R., VAN OPPEN, M. J. H., MIEOG, J. C., AND SINCLAIR, W. A community change in the algal endosymbionts of a scleractinian coral following a natural bleaching event: field evidence of acclimatization. **Proc. R. Soc. B.**, 275, 1359–1365. doi:10.1098/rspb.2008.0069, 2008.

JOSHI, S. Quantitative comparison of lighting technologies: Metal halide, t5 fluorescent and led. **Advanced Aquarist Online Magazine**, IX: [www.advancedaquarist.com/2010/2012/aafeature2012](http://www.advancedaquarist.com/2010/2012/aafeature2012), 2010.

KIMES, N. E.; GRIM, C. J.; JOHNSON, W. R.; HASAN, N. A.; TALL, B. D.; KOTHARY, M. H. et al. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **ISME J.**, 6, 835–846, 2011.

KIRKWOOD, M.; TODD, J. D.; RYPIEN, K. L.; JOHNSTON, A. W. B. The opportunistic coral pathogen *Aspergillus sydowii* contains dddP and makes dimethyl sulfide from dimethylsulfoniopropionate. **ISME J.**, 4, 147–150, 2010.

KLOEPPER, J. W.; AND SCHROTH, M. Plant growth-promoting rhizobacteria on radishes. **Proc. 4th Int. Conf. plant Pathog. Bact.**, 2, 879–882.1978.

KNOWLTON, N. The future of corals reef. **PNAS**, 98 (10), 5419-5425, 2001.

KONEMAN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; et al. Bacilos Gram-negativos não-fermentadores. **Diagnóstico Microbiológico**, 5th edn. Medsi, Rio de Janeiro, 263-279, 2001.

KRAUSE, G.H. & WEISS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis; the basics. **Ann. Rev. P.I Physiol. P.I Molec. Bio.**, 42, 313-349, 1991.

KREDIET, C. J.; RITCHIE, K. B.; PAUL, V. J.; TEPLITSKI, M. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. **Proc. Biol. Sci.**, 280. doi:10.1098/rspb.2012.2328, 2013.

KUMAR, T. T. A.; GUNASUNDARI, V.; PRAKASH, S. Breeding and Rearing of Marine Ornamentals. **Adv. in Mar. and Brack. Aqua.**, 101-107, 2015.

KUNTZ, N.M. *et al.* Pathologies and mortality rates caused by organic carbon and nutrient stressors in three Caribbean coral species. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 294, 173–180, 2005.

KUSHMARO, A., BANIN, E.; LOYA, Y.; STACKEBRANDT, E.; & ROSENBERG, E. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. **Int. J. Syst. Evol. Micro.**, 51,1–6, 2001.

KVENNEFORS, E. C. E.; SAMPAYO, E.; RIDGWAY, T.; BARNES, A. C.; HOEGH-GULDBERG, O. Bacterial communities of two ubiquitous Great Barrier Reef corals reveals both site- and species-specificity of common bacterial associates. **PLoS ONE**, 5, e10401, 2010.

KWIATKOWSKI, L.; COX, P.; HALLORAN, P. R.; MUMBY, P. J.; WILTSHIRE, A. J. Coral bleaching under unconventional scenarios of climate warming and ocean acidification. **Nat. Clim. Chang.**, 5, 777–781. doi:10.1038/nclimate2655, 2015.

LEAL, M.; CALADO, R.; SHERIDAN, C.; ALIMONTI, A.; OSINGA, R. Coral aquaculture to support drug discovery. **Trends in Biotechnology**, 31 (10), 555-561, 2013.

LEITE, A.; MIGUEL, M.A.; PEIXOTO, R.S.; ROSADO, A.S.; SILVA, J.T.; PASCHOALIN, V.M. Microbiological, technological and therapeutic properties of kefir: a natural probiotic beverage. **Braz. J. Micro.**, 44 (2), 341-349, 2013.

LEITE, A.; MIGUEL, M.; PEIXOTO, R.; RUAS-MADIEDO, P.; PASCHOALIN, V.; MAYO, B.; et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **J. Dairy Sci.**, 98, 3622–3632. doi: 10.3168/jds.2014-9265, 2015.

LEMA, K. A., WILLIS, B. L., AND BOURNE, D. G. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. **Appl. Environ. Micro.**, 78, 3136–3144. doi: 10.1128/AEM.07800-11, 2012.

LESSER, M. P.; BYTHELL, J. C.; GATES, R. D.; JOHNSTONE, R. W.; HOEGH-GULDBERG, O. Are infectious diseases really killing corals? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. **J. Exp. Mar. Biol. Ecol.**, 346, 36–44. (doi:10.1016/j.jembe.2007.02.015), 2007.

LESSER, M. P. & JARETT, J. K. Culture-dependent and culture-independent analyses

reveal no prokaryotic community shifts or recovery of *Serratia marcescens* in *Acropora palmata* with white pox disease. **FEMS Microbiol Ecol.**, 88, 457–467, 2014.

LEY, R. E.; HAMADY, M.; LOZUPONE, C.; TURNBAUGH, P. J.; RAMEY, R. R.; BIRCHER, J. S., et al. Evolution of mammals and their gut microbes. **Science**, 320, 1647–1651, 2008.

LUGTENBERG, B., AND KAMILOVA, F. Plant-growth-promoting rhizobacteria. **Annu. Rev. Micro.**, 63, 541–556. doi:10.1146/annurev.micro.62.081307.162918, 2009.

MAIA NETO, O. S.; ALVES Jr., N. Diversity and pathogenic potencial of vibrios isolated from Abrolhos Bank Corals. **Env. Micro. Rep.**, 2009.

MARGULIS, L. Origins of species: acquired genomes and individuality. **BioSystems**, 31 (2-3), 121-125, 1993.

MEYER, J.; DILLARD, B.; RODGERS, J.; RITCHIE, K.; PAUL, V.; TEPLITSK, M. Draft genome sequence of *Halomonas meridiana* R1t3 isolated from the surface microbiota of the Caribbean Elkhorn coral *Acropora palmata*. **Standards in Genomic Sciences**, doi 10.1186/s40793-015-0069-y, 2015.

MEYER, J. L.; GUNASEKERA, S. P.; SCOTT, R. M.; PAUL, V. J.; TEPLITSKI, M. Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. **ISME J.**, doi:10.1038/ismej.2015.184. doi:10.1038/ismej.2015.184, 2015.

MILES, A. A. and MISRA, S. S. The estimation of the bactericidal power of the blood. **J. of Hygiene**, Camb., 38, 732-749, 1938.

MILLER, J.; ROGERS, C. and WAARA, R. Monitoring the coral disease, plague type II, on coral reefs in St. John, US Virgin Islands. **Revista De Biologia Tropical**, 51, 47–55, 2003.

MOHAMED ALI, A.; SOLIMAN, Y. Antifouling activity of crude extracts from some red sea soft corals. **Thalassia Sal.**, 32, 73-89, 2009.

MOORHEAD, J. A.; ZENG, C. Development of captive breeding techniques for marine ornamental fish: a review. **Reviews in Fisheries Science**, 18, 315–343, 2010.

MOUCHKA, M. E.; HEWSON, I.; HARVELL, C. D. Coral-associated bacterial assemblages: Current knowledge and the potential for climate-driven impacts. **Integr. Comp. Biol.**, 50, 662–674. doi:10.1093/icb/icq061, 2010.

MUMBY, P.J.; BROAD, K.; BRUMBAUGH, D.R.; DAHLGREN, C.P.; HARBORNE, A.R.; HASTINGS, A.; HOLMES, K.E.; KAPPEL, C.V., MICHELI, F. & SANCHIRICO, J.N. Coral reef habitats as surrogates of species, ecological functions, and ecosystem services. **Conserv. Biol.**, 22, 941-951, 2008.

MURRAY, J. M. and WATSON, G. J. A Critical Assessment of Marine Aquarist Biodiversity Data and Commercial Aquaculture: Identifying Gaps in Culture Initiatives

to Inform Local Fisheries Managers. **PLoS ONE**, 9(9), e105982. doi:10.1371/journal.pone.0105982, 2014.

MURRAY, J. M.; WATSON, G. J.; BENTLEY, M. G.; GIANGRANDE, A. Regeneration as a novel method to culture marine ornamental sabellids. **Aquaculture**, 410–411, 129–137, 2013.

MURRAY, J. M.; WATSON, G. J.; GIANGRANDE, A.; LICCIANO, M.; BENTLEY, M. G. Managing the marine aquarium trade: Revealing the data gaps using ornamental polychaetes. **PloS One**, 7(1), e29543, 2012.

NG, W.-L.; & BASSLER, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. **Annu. Rev. Genet.**, 43, 197–222. doi:10.1146/annurev-genet-102108-134304, 2009.

OFFRET, C.; DESRIAC, F.; LE CHEVALIER, P.; MOUNIER, J.; JÉGOU, C.; FLEURY, Y. Spotlight on Antimicrobial Metabolites from the Marine Bacteria *Pseudoalteromonas*: Chemodiversity and Ecological Significance. **Mar. Drugs**, 14(7), 129, 2016.

OGAWA, T. and BROWN, C. Ornamental fish aquaculture and collection in Hawaii. **Aquar Sci Conserv**, 3(1–3), 151–169, 2001.

OLIVIER K. World trade in ornamental species. In: Cato J, Brown C (eds) **Marine ornamental species: collection, culture and conservation**, Iowa State Press, Ames, 49–63, 2003.

OLIVOTTO, I.; PLANAS, M.; SIMOES, N.; HOLT, G. J.; AVELLA, M. A. Advances in breeding and rearing marine ornamentals. **J. of the World Aquaculture Society**, 42, 135–166, 2011.

OLSON, N. D.; AINSWORTH, T. D.; GATES, R. D.; TAKABAYASHI, M. Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian Montipora corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. **J. Exp. Mar. Bio. Ecol.**, 371, 140–146. doi:10.1016/j.jembe.2009.01.012, 2009.

OSINGA, R.; SCHUTTER, M.; WIJGERDE, T.; RINKEVICH, B.; SHAFIR, S.; SHPIGEL, M.; et al. The CORALZOO project: a synopsis of four years of public aquarium science. **J. of the Mar. Biol. Assoc. of the UK**, 92, 753–768, 2012.

PAGE, C. A. & WILLIS, B. L. Epidemiology of skeletal eroding band on the Great Barrier Reef and the role of injury in the initiation of this widespread coral disease. **Coral Reefs**, 27, 257–272, 2008.

PALMER, C. V.; ROTH, M. S.; GATES, R. D. Red fluorescent protein responsible for pigmentation in trematode-infected *Porites compressa* tissues. **Biological Bulletin**, Marine Biological Laboratory, Woods Hole 216, 68–74, 2009.

PANDOLFI, J. Deep and complex ways to survive bleaching. **Nature**, 518, 43–44, 2015.

PATTERSON, K.; PORTER, J.; RITCHIE, K.; POLSON, S.; MUELLER, E.; PETERS, E.; SANTAVY, D.; SMITH, G. The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. **PNAS**, 99(13), 8725-8730, 2002.

PEIXOTO, R.; ROSADO, P.; LEITE, D.; ROSADO, A.; BOURNE, D. Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Micro.**, Submitted.

PERESI, J.T.M.; ALMEIDA, I.A.Z.C.; CARDIGA, E.A.; MARQUES, D.F.; CARNICEL, F.A.; HOFMANN, F.L. Susceptibilidade antimicrobiana de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* spp. isoladas de alimentos envolvidos em surtos de doenças bacterianas transmitidas por alimentos, ocorridos na região noroeste do Estado de São Paulo, no período de abril de 1990 a dezembro de 2003. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 65(2), 112-117, 2006.

PODILE, A.; AND KISHORE, G. Plant growth-promoting rhizobacteria. **Gnanamanickam SS Plant-Associated Bact. Springer, Netherlands**, 195–230. doi:10.1094/Phyto-71-642, 2007.

POLLOCK, F. J.; MORRIS, P. J.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Detection and Quantification of the Coral Pathogen *Vibrio coralliilyticus* by Real-Time PCR with TaqMan Fluorescent Probes. **App. and Env. Micro.**, 5282-5286, 2010.

POLY, F.; MONROZIER, L.; BALLY, R. Improvement in the RFLP procedure for studying the diversity of *nifH* genes in communities of nitrogen fixers in soil. **Research in Micro.**, 152(1), 95-103, 2001.

PRATTE, Z. A. Microbial functional genes associated with coral health and disease. **Dis. Aquat. Organ.**, 107, 161–171, 2013.

QIU, D. J.; HUANG, L. M.; HUANG, H.; YANG, J. H.; LIN, S. J. Two functionally distinct ciliates dwelling in *Acropora* corals in the South China Sea near Sanya, Hainan Province, China. **App. Env. Micro.**, 76, 5639–5643, 2010.

RÄDECKER, N.; POGOREUTZ, C.; VOOLSTRA, C. R.; WIEDENMANN, J.; WILD, C. Nitrogen cycling in corals: the key to understanding holobiont functioning? **Trends Micro.**, 23, 490–497. doi: 10.1016/j.tim.2015.03.008, 2015.

RAINA, J. B. et al. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. **Appl. Env. Micro.**, 75, 3492– 3501, 2009.

RAINA, J. B.; TAPIOLAS, D. M.; MOTTI, C. A.; FORET, S.; SEEMANN, T. et al. Isolation of an antimicrobial ^ compound produced by bacteria associated with reef-building corals. **Peer J.**, DOI 10.7717/peerj.2275, 2016.

RANDALL, J. E. Collecting reef fishes for aquaria. In Human Impacts on Coral Reefs: Facts and Recommendations. **Salvat B. ed. Antenne Museum E.P.H.E.**, French Polynesia: 29-39, 1987.

RESHEF, L.; KOREN, O.; LOYA, Y.; ZILBER-ROSENBERG, I.; ROSENBERG, E. The coral probiotic hypothesis. **Env. Micro.**, 8, 2068–2073. (doi:10.1111/j. 1462-2920.2006.01148.x), 2006.

RHYNE, A.; ROTJAN, R.; BRUCKNER, A.; TLUSTY M. Crawling to collapse: ecologically unsound ornamental invertebrate fisheries. **PLoS One**, 4, e8413, 2009.

RHYNE, A.; TLUSTY, M and KAUFMAN, L. Is sustainable exploitation of coral reefs possible? A view from the standpoint of the marine aquarium trade. **Current Opinion in Environmental Sustainability**, 7, 101-107, 2014.

RHYNE, A.; TLUSTY, M and KAUFMAN, L. Long-term trends of coral imports into the United States indicate future opportunities for ecosystem and societal benefits. **Conserv. Lett.**, 5, 478-485, 2012.

RIEGL, B.; BRUCKNER, A.; COLES, S.L.; RENAUD, P. & DODGE, R.E. Coral reefs: threats and conservation in an era of global change. **Ann. NY Acad. Sci.**, 1162, 136-186, 2009.

RITSON-WILLIAMS, R.; PAUL, V. J.; ARNOLD, S. N.; STENECK, R. S. Larval settlement preferences and post-settlement survival of the threatened Caribbean corals *Acropora palmata* and *A. cervicornis*. **Coral Reefs**, 29, 71–81. doi:10.1007/s00338-009-0555-z, 2010.

ROGERS, C. S. and MILLER, J. Coral disease cause reef decline. **Science**, 340(6140), doi: 10.1126/science.340.6140.1522-a, 2013.

ROSENBERG, E AND FALKOVITZ, L. The *Vibrio shiloi* / *Oculina patagonica* Model System of Coral Bleaching. **Ann. Rev. of Micro.**, 58(1), 143-159, 2004.

ROSENBERG, E.; KELLOGG, C. A.; ROHWER, F. Coral Microbiology. **Oceanography**, 20 (2) 147-154, 2007a.

ROSENBERG, E., KOREN, O., RESHEF, L., EFRONY, R., AND ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nat. Rev. Micro.**, 5, 355–362. doi: 10.1038/nrmicro1635, 2007b.

ROSENBERG, E.; KUSHMARO, A.; KRAMARSKY-WINTER, E.; BANIN, E. and YOSSU, L. The role of microorganisms in coral bleaching. **ISME J.**, 3, 139-146, 2009.

ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, 243, 1–10. doi:10.3354/meps243001, 2002.

RUTZLER, K. and SANTAVY, D. L. The black band disease of Atlantic reef corals 1. Description of the cyanophyte pathogen. **Marine Ecology**, 4, 301–320, 1983.

RYPIEN, K. L.; WARD, J. R.; AZAM, F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. **Env. Micro.**, 12, 28–39, 2010.

SANTIAGO-VAZQUEZ, L. Z.; BRUCK, T. B.; BRUCK, W. M.; DUQUEALARCON, A. P.; MCCARTHY, P. J.; KERR, R. G. The diversity of the bacterial communities associated with the azooxanthellate hexacoral *Cirripathes lutkeni*. **ISME J.**, 1, 654–659, 2007.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; DUARTE, G.; DINI-ANDREOTE, F.; CASTRO, C. B.; ROSADO, A. S.; et al. Climate change affects key nitrogen-fixing bacterial populations on coral reefs. **ISME J.**, doi:10.1038/ismej.2014.70, 2014.

SATO, Y.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Pyrosequencing-based profiling of archaeal and bacterial 16S rRNA genes identifies a novel archaeon associated with black band disease in corals. **Env. Micro.**, 15, 2994–3007, 2013.

SCHLEIF, R. F and WENSINK, P. C. Practical methods in molecular biology. **Springer-Verlag.**, New York, 1981.

SCHREZENMEIR, J., and DE VRESE, M. Probiotics, prebiotics, and symbiotics – approaching a definition. **Am. J. Clin. Nutr.**, 73 (Suppl.), 361–364, 2001.

SHARP, K. H.; DISTEL, D.; PAUL, V. J. Diversity and dynamics of bacterial communities in early life stages of the Caribbean coral *Porites astreoides*. **ISME J.**, 6, 790–801. doi: 10.1038/ismej.2011.144, 2012.

SHARP, K. H.; RITCHIE, K. B. Multi-partner interactions in corals in the face of climate change. **Biol. Bull.**, 223, 66–77, 2012.

SHIKUMA, N. J.; PILHOFER, M.; WEISS, G. L.; HADFIELD, M. G.; JENSEN, G. J.; NEWMAN, D. K. Marine Tubeworm Metamorphosis Induced by Arrays of Bacterial Phage Tail-Like Structures. **Science**, 343, 529–533. doi:10.1126/science.1246794, 2014.

SHNIT-ORLAND, M. and KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. **FEMS Micro. Ecol.**, 67, 371–380, 2009.

SHNIT-ORLAND, M., SIVAN, A., KUSHMARO, A. Antibacterial activity of *Pseudoalteromonas* in the coral holobiont. **Micro. Eco.**, 64, 851–859, 2012.

SHINZATO, C., M.; INOUE, KUSAKABE, M. A snapshot of a coral “holobiont”: a transcriptome assembly of the scleractinian coral, *Porites*, captures a wide variety of genes from both the host and symbiotic zooxanthellae. **PLoS One**, 9: e85182, 2014.

SHUMAN, C. S.; HODGSON, G.; AMBROSE, R. F. Population impacts of collecting sea anemones and anemonefish for the marine aquarium trade in the Philippines. **Coral Reefs**, 24, 564–573, 2005.

SIMBERLOFF, D. How common are invasion-induced ecosystem impacts? **Biological Invasions**, 13, 1255–1268, 2011.

SKERRATT, J.H.; NICHOLS, P.D.; MANCUSO, C.A.; JAMES, S.R.; DOBSON, S.J.; MCMEEKIN, T.A. The Phospholipid Ester-Linked Fatty Acid Composition of Members

of the Family *Halomonadaceae* and Genus *Flavobacterium*: A Chemotaxonomic Guide, **Syst. Appl. Microbiol.**, vol. 14, pp. 8–13, 1991.

SNEED, J. M.; SHARP, K. H.; RITCHIE, K. B.; PAUL, V. J. The chemical cue tetrabromopyrrole from a biofilm bacterium induces settlement of multiple Caribbean corals. **Proc. R. Soc. B.**, 281, 20133086, 2014.

SPALDING, M. D.; RAVILIOUS, C.; GREEN, E. P. World Atlas of Coral Reefs. **University of California Press**, Berkeley, 2001.

STELLA, J.; PRATCHETT, M.; HUTCHINGS, P.; JONES, G. Coral-associated invertebrates: diversity, ecology importance and vulnerability to disturbance. **Oceanography and Marine Biology: An Annual Review**, 49, 43–104, 2011.

STOECKL, N.; HICKS, C. C.; MILLS, M.; FABRICIUS, K.; ESPARON, M.; KROON, F.; KAUR, K.; COSTANZA, R. The economic value of ecosystem services in the Great Barrier Reef: our state of knowledge. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, 1219, 113–133, 2011.

STRAYER, D. L. Eight questions about invasions and ecosystem functioning. **Ecology Letters**, 15, 1199–1210, 2012.

SWEET, M. J.; JONES, R.; BYTHELL, J. C. Coral diseases in aquaria and in nature. **J. of the Mar. Bio. Assoc. of the United Kingdom**, 92: 791-801, 2011a.

SUSSMAN, M.; WILLIS, B. L.; VICTOR, S.; BOURNE, D. G. Coral pathogens identified for white syndrome epizootics in the Indo-Pacific. **Plos ONE**, 3(6), e2393. doi: 10.10371/journal.pone.0002393, 2008.

SUNAGAWA, S.; WOODLEY, C. M.; MEDINA, M. Threatened corals provide underexplored microbial habitats. **PLoS ONE**, 5, e9554, 2010.

SUTHERLAND, K. P. and RITCHIE, K. B. White pox disease of the Caribbean Elkhorn coral, *Acropora palmata*. **Coral Health and Disease**, 289–300, 2004.

SUTHERLAND, K. P.; SHABAN, S.; JOYNER, J. L.; PORTER, J. W.; LIPP, E. K. Human pathogen shown to cause disease in the threatened elkhorn coral *Acropora palmata*. **PLoS ONE**, 6, e23468. doi:10.1371/journal.pone. 0023468, 2011.

TAIT, K.; HUTCHISON, Z.; THOMPSON, F. L.; MUNN, C. B. Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. **Env. Micro. Rep.**, 2, 145–150. doi:10.1111/j.1758-2229.2009.00122.x, 2010.

TEBBEN, J.; TAPIOLAS, D. M.; MOTTI, C. A.; ABREGO, D.; NEGRI, A. P.; et al. Induction of Larval Metamorphosis of the Coral *Acropora millepora* by Tetrabromopyrrole Isolated from a *Pseudoalteromonas* Bacterium. **PLoS ONE**, 6(4): e19082. doi:10.1371/journal.pone.0019082, 2011.

TEITELBAUM, A.; YEETING, B.; KINCH, J.; PONIA, B. Aquarium trade in the pacific. **SPC Live Reef Fish Information Bulletin**, 19, 3-6, 2010.

TEPLITSKI, M. and RITCHIE, K. How feasible is the biological control of coral disease. **Trends in Ecology and Evolution**, 24(7), 378-385, 2009.

THOMPSON, J. R.; RIVERA, H. E.; CLOSEK, C. J.; MEDINA, M. Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. **Front. Cell. Infect. Micro.**, 4, 176. doi: 10.3389/fcimb.2014.00176, 2014.

TISSOT, B. N.; BEST, B. A.; BORNEMAN, E. H.; BRUCKNER, A. W.; COOPER, C. H. et al. How USA ocean policy and market power can reform the coral reef wildlife trade. **Mar Policy**, 34, 1385–1388, 2010.

TLUSTY, M.; RHYNE, A.; KAUFMAN, L.; HUTCHINS, M.; REID, G.; ANDREWS, C.; BOYLE, P.; HEMDAL, J.; MCGILVRAY, F.; DOWD, S. Opportunities for public aquariums to increase the sustainability of the aquatic animal trade. **Zoo. Biol.**, 32, 1-12, 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. 8.ed, Porto Alegre: Editora Artmed, 894p, 2005.

TOUT, J.; JEFFRIES, T. C.; WEBSTER, N. S.; STOCKER, R.; RALPH, P. J.; SEYMOUR, J. R. Variability in microbial community composition and function between different niches within a coral reef. **Microb Ecol.**, 67: 540–552, 2014.

TREMBLAY, P.; GROVER, R.; MAGUER, J.; LEGENDRE, L.; FERRIER-PAGÈS, C. Autotrophic carbon budget in coral tissue: a new <sup>13</sup>C-based model of photosynthate translocation. **J. Exp. Biol.**, 215, 1384–1393. doi:10.1242/jeb.065201, 2012.

TURNBAUGH, P. J.; HAMADY, M.; YATSUNENKO, T.; CANTAREL, B. L.; DUNCAN, A.; LEY, R. E.; et al. A core gut microbiome in obese and lean twins. **Nature**, 457, 480–484, 2008.

UNITED NATIONS ENVIRONMENT PROGRAMME (UNEP). Corals and Mangroves in the Front Line. **Economic Case for Conservation of Corals and Mangroves Made in New UN Environment Report**. 2006.

USHIJIMA, B.; VIDEAU, P.; BURGER, A. H.; SHORE-MAGGIO, A.; RUNYON, C. M.; SUDEK, M.; et al. *Vibrio coralliilyticus* Strain OCN008 is an etiological agent of acute Montipora White Syndrome. **Appl. Env. Micro.**, 80, 2102–2109, 2014.

VAN NOOD, E. et al. Duodenal infusion of donor feces for recurrent *Clostridium difficile*. **N. Engl. J. Med.**, 368, 407–415, 2013.

VAN OPPEN, M.; OLIVER, J. K.; PUTNAM, H. M.; GATES, R. D. Building coral reef resilience through assisted evolution. **PNAS**, 112(8), 2307–2313, 2015.

VARALJAY, V.; HOWARD, E.; SUN, S.; MORAN, M. Deep sequencing of a dimethylsulfoniopropionate-degrading gene (*dmdA*) by using PCR primer pairs designed on the basis of marine metagenomic data. **App. Envir. Micro.**, 76(2), 609-617, 2010.

VEGA THURBER, R. L.; BURKEPILE, D. E.; FUCHS, C.; SHANTZ, A. A.; MCMINDS, R.; ZANEVELD, J. R. Chronic nutrient enrichment increases prevalence and severity of coral disease and bleaching. **Glob. Chang. Biol.**, 20, 544–554. doi:10.1111/gcb.12450, 2014.

VERBRUGGEN, H. & TRIBOLLET, A. Boring algae. **Curr. Biol.**, 21, 876–877. doi:10.1016/j.cub.2011.09.014, 2011.

VERON, J. E. N. Corals of the World, Volumes 1–3. **Australian Institute of Marine Science**, Townsville, Australia, 2000.

VERSCHUERE, L.; ROMBAUT, G.; SORGELOOS, P.; VERSTRAETE, W. Probiotic Bacteria as Biological Control Agents in Aquaculture. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.** 64, 655–671, 2000.

VIDAL-DUPIOL, J.; LADRIERE, O.; MEISTERTZHEIM, A.; FOURE, L.; ADJEROUD, M.; MITTA, G. Physiological responses of the scleractinian coral *Pocillopora damicornis* to bacterial stress from *Vibrio coralliilyticus*. **J. Exp. Biol.**, 214, 1533–1545, 2011a.

VIDAL-DUPIOL, J.; et al. Innate immune responses of a scleractinian coral to vibriosis. **J. Biol. Chem.**, 286(25):22688–22698, 2011b.

VINCENT, A. C. J. Live food and non-food fisheries on coral reefs, and their potential management. In: Cote IMRJD (ed) **Coral Reef Conservation**, 183-236, 2006.

VIZCAINO, M. I.; JOHNSON, W. R.; KIMES, N. E.; WILLIAMS, K.; TORRALBA, M.; NELSON, K. E., et al. Antimicrobial resistance of the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* and Caribbean sister phylotypes isolated from a diseased octocoral. **Micro. Ecol.**, 59, 646–657, 2010.

WABNITZ, C.; TAYLOR, M.; GREEN, E. and RAZAK, T. From ocean to aquarium. **UNEP-WCMC**, Cambridge, UK, 2003.

WEBSTER, N. S.; SMITH, L. D.; HEYWARD, A. J.; WATTS, E. M.; WEBB, R. I.; BLACKALL, L. L., et al. Metamorphosis of a Scleractinian Coral in Response to Microbial Biofilms Metamorphosis of a Scleractinian Coral in Response to Microbial Biofilms. **Appl. Env. Micro.**, 70, 1213–1221. doi:10.1128/AEM.70.2.1213, 2004.

WIEBE, W.J.; JOHANNES, R.; WEBB, K. Nitrogen fixation in a coral reef community. **Science**, 188, 257–259, 1975.

WILD, C.; HUETTEL, M.; KLUETER, A.; KREMB, S. G.; RASHEED, M. Y. M.; JORGENSEN, B. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. **Nature**, 428, 66–70, 2004.

WILD, C.; NAUMANN, M.; NIGGL, W.; HAAS, A. Carbohydrate composition of mucus released by scleractinian warm- and coldwater reef corals. **Aquat. Biol.**, 10, 41–45, 2010.

WILKINSON, C. Status of coral reefs of the World 2002. **GCRMN.**, Australian Institute of Marine Science, Townsville, Australia, 7-44, 2002.

WILLIS, B.; PAGE, C. A.; DINSDALE, E. A. Coral disease on the Great Barrier Reef. **In Coral Health and Diseases**, E. Rosenberg and Y. Loya, eds, Springer Verlag, NY, 69–103, 2004.

WILSON, B.; AEBY, G. S.; WORK, T. M.; BOURNE, D. G. Bacterial communities associated with healthy and Acropora white syndrome-affected corals from American Samoa. **FEMS Micro. Ecol.**, 80, 509–520, 2012.

WOOD, E. M. Collection of coral reef fish for aquaria: Global trade, conservation issues and management strategies. **UK: Marine Conservation Society**, 2001.

ZANEVELD, J. R.; BURKEPILE, D. E.; SHANTZ, A. A.; PRITCHARD, C. E.; MCMINDS, R.; PAYET, J. P.; THURBER, R. V. Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. **Nature Commun.**, 7. doi: 10.1038/ncomms11833, 2016.