

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

DENISE DA PIEDADE SILVA



Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação química e biológica

RIO DE JANEIRO

2019

DENISE DA PIEDADE SILVA



Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação química e biológica



Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Orientadores: Raquel da Silva Peixoto
Caio Tavora Rachid Coelho da Costa

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL
E BIOPROCESSOS
JUNHO 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

S586a Silva, Denise da Piedade
Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação química e biológica / Denise da Piedade Silva. -- Rio de Janeiro, 2019.
197 f.

Orientador: Raquel Silva Peixoto.
Coorientador: Caio Tavora Rachid Coelho da Costa.
Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2019.

1. Derramamento de óleo. 2. Mesocosmo. 3. Corexit 9500. 4. Biorremediação. 5. *Millepora alcicornis*.
I. Silva Peixoto, Raquel, orient. II. Tavora Rachid Coelho da Costa, Caio, coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

Denise da Piedade Silva

Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação química e biológica

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

Rio de Janeiro de 2019.

(Raquel Silva Peixoto, Prof^ª. Dr^ª. IMPG, UFRJ)

(Caio Tavora Rachid Coelho da Costa, Prof. Dr. IMPG, UFRJ)

(Fernanda D'avila Abreu, Prof^ª. Dr^ª. IMPG, UFRJ)

(Márcio Alves Ferreira, Prof. Dr. IB, UFRJ)

(Diogo de Azevedo Jurelevicius Prof. Dr. IMPG, UFRJ)

(Fabio Mota, Prof. Dr. Fiocruz, UFRJ)

(Ana Maria Mazotto de Almeida, Prof^ª. Dr^ª. IMPG, UFRJ)

“Imagine que você está à beira-mar e você vê um navio partindo
Você fica olhando, enquanto ele vai se afastando cada vez mais longe
Até que finalmente aparece apenas um ponto no horizonte
Lá onde o mar e o céu se encontram
E você diz: "Pronto, ele se foi"
Foi aonde? Foi a um lugar que sua vista não alcança. Só isto.
Ele continua grande. Tão bonito e tão importante como era quando estava com
você." Henry Sobel

Ao meu pai Osmar (*in memoriam*), por todo amor e dedicação para que eu
pudesse alcançar meus objetivos.

À minha mãe Rose que é a minha força para continuar a caminhada.

A todos que me apoiaram e me incentivaram nesta trajetória.

Por gratidão,

Dedico.

Agradecimentos

À Deus pela dádiva de viver e por sempre escutar as minhas preces nos momentos de aflição. Aprendi que tudo tem o seu momento.

Aos meus amados pais Rose e Osmar (*in memorian*) que sempre foram os meus pilares. Obrigada por serem os melhores pais que eu poderia ter. Quanto amor incondicional e apoio eu recebi. Vocês não me deram somente a vida, mas me educaram e ensinaram valores que levarei comigo para onde eu for. Serei eternamente grata por tudo. Amo vocês.

À minha irmã Deise pelo companheirismo, amor e carinho. Que possamos nos manter unidas e amigas. Mesmo longe, às vezes, sempre estarei com você. Obrigada por me dar o maior presente que eu poderia receber... o meu sobrinho Nicolas.

Ao meu namorado Ryan Hill por todo amor e companheirismo. Obrigada por ser essa pessoa incrível e por estar presente quando me senti frágil e sem chão. Por sempre acreditar em mim e não largar a minha mão. Você foi luz na minha vida. Aproveito para agradecer também a Molly Piedade Hill (*in memorian*) por todo amor e lealdade. Saudades da minha grande companheira. Éramos tipo “*partners in crime*”, minha estrelinha!

À minha orientadora Prof. Raquel Peixoto primeiramente por permitir que eu fizesse parte do grupo. Nesses 4 anos o LEMM foi minha segunda família. Obrigada pela orientação, amizade, carinho, preocupações, aprendizado e por sempre acreditar em mim... até muito mais que eu. Agradeço imensamente pelos conselhos nos momentos turbulentos, sempre com palavras positivas e verdadeiras. Além disso, você me deu a oportunidade de viver experiências profissionais que jamais imaginaria viver e sou muito grata por isso.

Ao meu co-orientador Caio Rachid pelo aprendizado, amizade, constante apoio e carinho. Por ter me puxado literalmente do “fundo do poço” e não ter deixado eu desistir. Obrigada pelas inúmeras vezes que você me mostrou que eu era capaz de encarar todas as adversidades da vida, inclusive a perda do meu pai. Você enxergou uma força que eu jamais imaginaria ter.

À prof. Rebecca Lissette Vega Thurber por ter me recebido de braços abertos e por sempre estar disposta a ajudar, principalmente quando me vi tão perdida. Vivemos algo muito parecido

e sua empatia foi crucial naquele momento. Muito Obrigada. Gratidão!

Ao Professor Alexandre Rosado pelo grande apoio amizade, pelos momentos de descontração e pela ajuda sempre que precisamos, inclusive no PROCORAIS.

À Lalazinha que por mais distante que esteja, sempre se faz presente. Obrigada pelos conselhos e por sempre estar lá quando eu mais precisava. Obrigada pelos momentos de grandes risadas, e por escutar, com paciência, os meus áudios de 13 minutos (risos). Você é e sempre será uma amiga especial.

À Debynha por ser sempre esse pessoal excepcional. *“É nos momentos difíceis que percebemos que os amigos são o que de mais importante temos na vida...”*. Você esteve no momento mais importante. Jamais irei esquecer disso. Sou muito grata por ser agraciada pela sua amizade e por ter dividido tantos momentos bons com você.

À Carolzinha pelo companheirismo nos momentos difíceis e pela grande amizade. Obrigada por ter me dado forças, sempre. Para você, sempre tento transmitir os ensinamentos que obtive ao longo da vida, mas também aprendo muito com você. Obrigada.

Ao Lipe por qual tenho um imenso respeito e admiração profissional. Você é o cara. Obrigada por ser esse grande amigo. Obrigada por toda a ajuda durante o doutorado, pelos conselhos e momentos de descontração. Você é muito especial.

Ao Edir e Marcos pela grande amizade, inúmeros momentos de descontração e por sempre me apoiar nos momentos de dificuldade. Obrigada por sempre estarem presentes. Obrigada por tudo.

À Adriana Soriano por conduzir o projeto PROCORAIS com maestria. Você sempre esteve disposta para toda equipe, participando até mesmo das coletas de campo. Foram momentos inesquecíveis durante esses 4 anos. Agradeço também a equipe do CENPES/PETROBRAS pela grande ajuda e apoio ao longo do projeto. Sou muito grata a todos.

Aos amigos do LEMM: Henrique, Flávia, Hugo, Fernanda, Carol Frere, Bebeto, Yuri, Angela, Zé Roberto, Emiliano, Analy, Gustavo, João, Camila, Dandara, Mylena e Manuela por terem sido

companheiros ao longo dessa jornada e por me ajudarem a evoluir pessoalmente e profissionalmente. Agradeço as “Lemmetes”: Caren, Erika, Juliana e Junia pela grande amizade e ajuda ao longo do doutorado. Vocês fizeram os meus dias mais leves diante tanto trabalho. Agradeço em especial a Helena por ter sido minha parceira no doutorado. Como aprendi com você. Obrigada meninas, por estarem comigo nesses últimos 4 anos.

Aos amigos do LABEM: Duduca, Digo, Douglas, Fernandinha, Caren, Isa, Milena, Ju, Amanda, Prof. Mateus Godoy e Prof. Diogo Jurelevicius. Vocês não têm noção o quanto sou grata a todos. Muito obrigada por tirarem um sorriso do meu rosto nos momentos em que não conseguia sorrir. Obrigada por terem sido os amigos mais engraçados e companheiros durante esses últimos meses.

Aos amigos do laboratório Vega Thurber: Emily, Adriana, Becca, Grace, Ryan, Sonora e Leila vocês foram importantes no meu processo de adaptação nos EUA. Obrigada pela paciência, apoio e amizade. Em especial a Emily e Adriana que foram minhas companheiras diárias no laboratório e no aprendizado de bioinformática. Vocês são incríveis.

Aos professores do PBV por todo ensinamento e incentivo perante a todos os problemas que estamos enfrentando. Muito Obrigada. Em especial ao Professor Andrew pelo apoio e por entender todo o processo que eu estava vivendo. Obrigada pela sua empatia, isso é uma qualidade de poucos. Quero também agradecer em especial a professora Fernanda Reinert pelos sábios conselhos. Jamais esquecerei, grata!

Aos professores membros da banca, muito obrigada por aceitarem o convite para participar deste momento único.

Aos meus amigos Thiago, Amanda, Yara e Ivana pelos grandes momentos de descontração e por enfrentarem comigo todas as dificuldades e descobertas de viver uma vida fora do país de origem. Esse processo só fortificou nossa amizade. Meus irmãos, meus amigos!

À minha amiga Luiza por ser tão especial. Presente que a graduação me deu e que estamos consolidando essa amizade há 15 anos. Sei que sempre estará por perto. Obrigada por tudo.

Aos Amigos de Corvallis (EUA), Johanna, Chas, Emi, Jiajia, Sr. Carson, Ben, Kirsten, Heitho, Sr. Scott (EPA), Sr. Phill (EPA), Molly, Serham, AJ, Leila, Felipe e Claudia vocês foram essenciais para que a minha estadia em Corvallis fosse uma experiência incrível. Obrigada pelas festas, momentos de risadas, pelos cafés após o almoço, pelas conversas, pelas caminhadas e pelas festinhas surpresa de aniversário e despedida. Quanto carinho eu tenho por vocês. Obrigada.

Aos amigos do mestrado: Arnaldo, Antonia, Graci, Déia, Mari, Ingrid e Igor pelo companheirismo durante esses 11 anos. Que a nossa união se fortaleça a cada dia.

A todos que de alguma forma contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal e na execução desse trabalho, agradeço!

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas graças a Deus, não sou o que era antes”.*

(Martin Luther King)

RESUMO

SILVA, Denise da Piedade. Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

A exploração do óleo é uma atividade necessária para a sociedade. No entanto, acidentes envolvendo o despejo de hidrocarbonetos petrogênicos no ambiente marinho ocorrem ocasionalmente. Estes contaminantes podem alcançar as áreas de recifes, afetando os corais, incluindo sua relação simbiótica com o microbioma associado (coral holobionte). Recifes de corais impactados causam prejuízos a fauna associada e a economia das comunidades costeiras, que dependem dos recursos marinhos que estão direta ou indiretamente relacionados aos corais. Visando a mitigação da contaminação por óleo, as estratégias de remediação químicas e biológicas são utilizadas mundialmente pelas companhias petrolíferas, inclusive em casos de pequenos derramamentos de óleo. Não são conhecidos relatos na literatura sobre o impacto das estratégias de remediação baseadas em dispersantes químicos combinadas com o óleo sobre o bacterioma de corais. Além disso, estudos realistas sobre o efeito desses contaminantes são raros ou inexistentes, devido as dificuldades de mimetizar as condições naturais. Desta forma, esta tese foi desenvolvida seguindo duas vertentes experimentais: i) o desenvolvimento de um sistema de mesocosmo que reproduz as condições realistas do ambiente marinho durante o derramamento de óleo; ii) a avaliação do impacto do óleo, do dispersante químico Corexit 9500c e de um consórcio microbiano biorremediador (com potencial efeito benéficos para corais e composto por representantes micro-organismos (fungos, levedura e bactérias) na saúde do hidrocoral *Millepora alcicornis* e no seu bacterioma. O sistema de mesocosmo foi construído a partir de um sistema de aquários replicados em blocos, alimentados por sistemas autônomos de controle de fluxo de água. O desempenho do mesocosmo foi avaliado através de experimentos com diferentes configurações utilizando *M. alcicornis* como modelo biológico para simular duas magnitudes de vazamentos de óleo (0.07% e 1% v/v de óleo). Os parâmetros físico-químicos permaneceram dentro das faixas de condições

naturais observadas em ambientes marinhos brasileiros entre os replicados e em todos os tratamentos ao longo do tempo. No parâmetro biológico, a concentração de 1% v/v de óleo afetou o potencial fotossintético (F_v/F_m) das algas associadas a *M. Allicornis*, provando que o sistema de mesocosmo permitiu a entrega do contaminante aos aquários experimentais. Este mesocosmo é personalizável e ajustável para vários tipos de experimentos e provou ser eficaz para estudos de derramamentos de óleo. Já os experimentos de avaliação dos impactos dos fatores supracitados foram feitos avaliando a saúde da *M. allicornis* através do potencial fotossintético (F_v/F_m), e as condições ambientais através do monitoramento dos parâmetros físico-químicos e degradação de hidrocarbonetos. Já a resposta do bacterioma foi feita a partir do sequenciamento do gene que codifica a subunidade 16S rRNA, amplificado do DNA extraído dos hidrocorais. Na avaliação dos impactos do óleo e remediadores, o consórcio foi eficiente sendo capaz de proteger o hidrocoral holobionte quando exposto ao óleo, mas não contra o dispersante. O COREXIT 9500Cc foi altamente tóxico para a fisiologia e saúde da *M. Allicornis* em um curto tempo, reduzindo a sua capacidade fotossintética e alterando drasticamente o seu bacterioma. Foram identificados gêneros bacterianos indicadores da presença do COREXIT 9500Cc, como os *Roseovarius* sp., *Erythrobacter* sp. e *Desulfovibrio* sp e gêneros indicadores da ausência como a *Endozoicomonas* sp. Os gêneros indicadores da presença do dispersante parecem ter alguma relação filogenética sugerindo que o contaminante é responsável por interromper a interação do hidrocoral com o bacterioma associado.

Palavras-chave: Derramamento de óleo, Mesocosmo, Impacto antropogênico, Biorremediação, Corexit 9500c, Hidrocoral, *Millepora allicornis*.

ABSTRACT

Denise da Piedade Silva

Silva, Denise da Piedade. Avaliação do bacterioma do hidrocoral *Millepora alcicornis* frente aos impactos da poluição causada pelo derramamento de óleo e estratégias de remediação. Rio de Janeiro, 2019. Tese (Doutorado em Ciências - Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) – Decania do Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2019.

Oil exploitation is an essential activity for our modern society. However, accidents involving the dumping of petrogenetic hydrocarbons into the marine environment can occur occasionally. These contaminants can reach reef areas, affecting corals, including their symbiotic relationship with the associated microbiome (coral holobiont). Impacted coral reefs can damage the associated fauna and the economy of coastal communities, which depend on marine resources directly or indirectly provided by these reefs. In order to mitigate oil contamination, chemical and biological remediation strategies are used worldwide by oil companies. To the best of our knowledge, no reports about the impact of chemical dispersants on the coral microbiome are available in the literature. Moreover, realistic studies on the effect of these contaminants are rare because it is very difficult to minimize the natural conditions. In this way, this thesis was developed following two experimental lines: i) the development of a mesocosm system that reproduces the realistic conditions of the marine environment during the oil spill; ii) assessment of the oil spill impact, the chemical dispersant Corexit 9500cc and a microbial bioremediation consortium (with potential beneficial effect on corals, composed by multi-domain representatives, i.e., fungi, yeast and bacteria), on the health of the hydrocoral *Millepora alcicornis* and its bacteriome. The mesocosm system was constructed with blocks replicated aquariums fed by autonomous water flow control systems. The performance of the mesocosm was evaluated through experiments with different configurations using the *M. alcicornis* as biological model to simulate two magnitudes of oil leaks (0.07% and 1% v/v oil). The physical-chemical parameters remained within the ranges of natural conditions observed in Brazilian marine environments between replicates and in all treatments throughout time. As for the biological parameter, the concentration of 1% v/v

of oil affected the photosynthetic potential (F_v/F_m) of the microalgae associated with *M. Alcornis*, showing that the mesocosm system has allowed the delivery of the contaminant to the experimental aquariums. This mesocosm is customizable and adjustable for various types of experiments and showed to be effective for studies of oil spills. The experiments to address the impact of oil and the remediators on the *M. alcornis* health and its bacteriome were done evaluating the photosynthetic potential (F_v/F_m) and the environmental conditions through the monitoring of the physical-chemical parameters and the degradation of hydrocarbons. The bacteriome response was evaluated by sequencing the gene encoding the 16S rRNA subunit, amplified from the DNA extracted from the hydrocorals. The microbiome consortium was able to protect the hydrocoral holobiont when exposed to the oil, but not against the dispersant. The COREXIT 9500Cc was highly toxic to the physiology and health of *M. alcornis* in a short time, reducing its photosynthetic capacity and drastically altering the associated bacteriome. Were identified bacterial genera indicative of the presence of COREXIT 9500Cc, *Roseovarius* sp., *Erythrobacter* sp. e *Desulfovibrio* sp and absence indicators as *Endozoicomonas* sp. The dispersant indicators seem to have a phylogenetic relationship suggesting that the contaminant is responsible for disrupting the interaction between hydrocoral and its bacteriome.

Keywords: Oil Spill, Anthropogenic impacts, Bioremediation, Corexit 9500cc, Hydrocoral, *Millepora alcornis*.

LISTA DE FIGURAS e TABELAS

Figura 1: Esquemática de um pólipó coralíneo.

Figura 2: Ilustração da interação dos recifes de corais com outros animais marinhos.

Figura 3: Ilustração de exemplos serviços e benefícios fornecidos por ecossistemas de recifes de corais.

Figura 4: Distribuição mundial dos corais nas regiões tropicais e semitropicais.

Figura 5: Corais e hidrocorais endêmicos da costa brasileira. A) *Mussismilia braziliensis*, B) *Mussismilia hispida*. C) *Mussismilia harttii*, D) *Favia gravida*, E) *Siderastraea stellata*, F) *Mussismilia leptophylla*, G) *Millepora nitida*, H) *Millepora braziliensis*.

Figura 6: Colônia do hidrocoral *Millepora alcicornis*.

Figura 7: Representação da relação do coral com outros micro-organismos e suas respectivas funções.

Figura 8. Esquemática do processo de branqueamento dos corais.

Figura 9: Localização da província petrolífera no Sudeste da costa brasileira próximo à Armação dos Búzios.

Figura 10: Diversas plataformas offshore utilizadas atualmente.

Figura 11: Vazamento de óleo no Campo de Frade- RJ.

Figura 12: Localização dos recifes de coral ao redor do mundo e as principais rotas de transporte do petróleo nos oceanos.

Figura13: Métodos de remediação: A) Físico (uso de barreiras de contenção, skimmers, materiais absorventes e adsorventes); B) Químico (uso de dispersantes); C) Térmico (queima *in situ* do petróleo de forma controlada).

Figura 14: Esquemática da dispersão do óleo causada por dispersantes químicos.

Figura 15: Esquema em 3D dos blocos que acomodam os tratamentos químicos e biológico ilustrado pelo software SketchUp Pro.

Figura 16: Plano do sistema de mesocosmo: seção de armazenamento de água do mar: tanque primário de armazenamento de água do mar (1), tanques secundários de armazenamento de água do mar (2); tanque suspenso (3); Seção de estoque de contaminantes: tratamentos de remediação química e biológica (4) e (6) e tanques de diluição (5); Seção de aquários experimentais: telhado de policarbonato (7); aquários e

banhos de água (8); reservatório de água fria (9) e unidade de resfriamento (10).

Figura 17: Esquema do sistema de mesocosmo: seção de armazenamento de água do mar: tanque primário de armazenamento de água do mar (1), tanque secundário de armazenamento de água do mar (2), tanque suspenso (3); Seção de estoque de contaminantes: tratamentos de remediação química e tanques de diluição (4), (5) e (7); e seção de aquários experimentais: aquários e banhos de água (6).

Figura 18: Seção de estoque de contaminantes: Armazenamento das caixas de estoque na parte superior abaixo do telhado de polipropileno e as caixas de diluição armazenadas na parte intermediária da estrutura.

Figura 19: Vista esquemática da seção experimental dos aquários (1), aquários experimentais (2); suportes para banho-maria (3); teto de policarbonato (4); reservatório de água fria (5); unidade de refrigerador (6); 2 reservatórios de 20 mil L de água (7).

Figura 20: Esquema em 3D da seção de aquários experimentais realizado pelo programa SketchUp Pro.

Figura 21: Módulo separador de água e óleo, B) módulo aplicado no sistema de mesocosmo.

Figura 22: Fluxograma esquemático do fluxo da água do experimento no sistema mesocosmo.

Figura 23: Mapa da localização da Praia de João Fernandes (22°44'29.95"S; 41°52'35.62"O) e do Mesocosmo PROCORAIS (22°45'44.22"S; 41°53'3.97"O) em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil.

Figura 24: Distribuição dos meios de cultivo com FIA nas placas de petri.

Figura 25: Teste de antagonismos de bactérias (A) e leveduras(B).

Figura 26: Produção da massa celular dos isolados em biorreatores com capacidade de 5 L com sistema de *air-lift*.

Figura 27: Etapas do preparo do consórcio degradador de óleo: 1) Coleta do hidrocoral *Millepora alcicornis*; 2) Maceração dos fragmentos de coral; 3) Plaqueamento em meio seletivo contendo frações do óleo como única fonte de carbono; 4) Extração de DNA dos isolados selecionados; 5) Teste de antagonismo entre os isolados selecionados; 6) Montagem final do consórcio.

Figura 28: Representação do sistema de aquários em blocos casualizados utilizados no

sistema de mesocosmo PROCORAIS.

Figura 29: Esquematização do delineamento experimental.

Figura 30: Esquema da análise do bacterioma do hidrocoral *M. alcornis* baseado no sequenciamento do 16S rRNA.

Tabela 1: Metodologias certificadas pela empresa FOSS.

Tabela 2. Tratamentos e condições experimentais.

LISTA DE ABREVIACÕES

BH: *Bushnell-Haas*

BMC: *Beneficial Microorganisms for Corals*

ddNTP: didesoxiribonucleotídeo

DO: Densidade óptica

DOC: *Dissolved Organic Carbon*

HPA: Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HTP: Hidrocarbonetos Totais do Petróleo

ISO: *International Organization for Standardization*

LB: *Luria Bertani Broth*

MB: *Marine Broth*

MA: *Marine Agar*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NMDS: *Non-metric multidimensional scaling*

OTUs: Unidades taxonômicas operacionais

ON: Overnight

oWIF: *Oil water-insoluble fraction*

oWSF: *Oil water-soluble fraction*

PAH: *Polycyclic aromatic hydrocarbon*

pBMC-BC: *Potencial beneficial microorganisms for corals – Bioremediator consortium*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

RDP: Ribossomal database project

TPH: *Total Petroleum Hydrocarbon*

UFC: Unidade formadora de colônia

US EPA: *Environmental Protection Agency – United States (USA)*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Corais	21
1.2.	Microbiologia dos corais	27
1.3.	Ameaças antrópicas aos ambientes coralíneos.....	34
1.3.1	Poluição causada por derramamento de óleo	35
1.4	Métodos de remediação do ambiente marinho contaminado por óleo	40
2	JUSTIFICATIVA.....	49
3	OBJETIVOS	50
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	52
4.1	Construção do Mesocosmo PROCORAIS no Centro de Estudos de Biorremediação de Óleo em Ambientes Marinhos (artigo 1).....	52
4.1.1	Ensaio de validação 1	61
4.1.2	Ensaio de validação 2	61
4.1.3	Coleta do hidrocoral <i>M. alcicornis</i> em campo.....	62
4.1.4.5.	Validação biológica - Capacidade fotossintética máxima do fotossistema II (F_v/F_m).....	65
4.3	Isolamento do Consórcio microbiano degradador de óleo.....	67
4.3.1	Preparação de meios de cultura e soluções.....	67
4.3.2	Coleta dos corais e da água circundante.....	69
4.3.3	Isolamento dos potenciais micro-organismos degradadores de óleo	69
4.3.4	Identificação dos potenciais biodegradadores de óleo	70
4.3.4.1	Extração de DNA dos micro-organismos potenciais degradadores.....	70
4.3.4.2	Sequenciamento dos isolados do consórcio microbiano	71
4.4.	Curva de crescimento bacteriano	72
4.5	Teste de antagonismo	73
4.6.	Experimento em mesocosmo	74
4.6.1	Preparo do consórcio degradador de óleo.....	74
4.6.2	Delineamento experimental.....	76
4.6.2.1	Análise dos parâmetros físico-químicos	78
4.6.2.1.1	Temperatura, salinidade e pH	78

4.8.2.1.2	Quantificação de nutrientes e carbono orgânico dissolvido (COD)	78
4.8.2.1.3	Quantificação de fosfato.....	78
4.8.2.1.4	Quantificação de hidrocarbonetos de petróleo	79
4.8.2.2	Capacidade fotossintética máxima do fotossistema II das algas simbióticas fotossintéticas (Fv / Fm)	79
4.6.3	Análises estatísticas dos parâmetros físico-químicos e Fv/Fm.....	80
4.6.4.1	Processamento de amostra e extração de DNA total da <i>M. alcornis</i>	80
4.6.4.2	Preparação das bibliotecas e sequenciamento do RNAr do 16S	81
4.6.4.3	Análises de bioinformática.....	81
5	RESULTADOS / ARTIGOS	84
5.1	Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals.....	84
5.2	Multi-domain probiotic consortium as an alternative to chemical remediation of oil spill in coral reefs in a changing world	99
6	CONCLUSÃO	138
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	142
8	ANEXOS	159

1. INTRODUÇÃO

1.1. Corais

Os corais são organismos invertebrados classificados no filo Cnidaria e na classe Anthozoa que geralmente vivem sob a forma de colônias, podendo conter um ou mais pólipos (ROHWER; YOULE, 2010). Os pólipos podem variar de tamanho de acordo com a estrutura coralínea, de cerca de um milímetro de diâmetro a mais de 20 centímetros dependendo da espécie (GOREAU, T. F.; GOREAU, N. I.; GOREAU, T. J., 2010, SAKAI, 1998). Estes possuem uma estrutura simples formada por epiderme (camada externa), mesoglêia (matriz extracelular intermediária com aspecto gelatinoso e composta por polissacarídeo e colágeno) e gastroderma (camada interna que compreende a maior parte do aparelho digestivo do coral) (ROSENBERG, 2009) (Figura 1). Os pólipos também possuem uma cavidade gastrovascular (boca) a qual a maioria dos alimentos são capturados com o auxílio de células especiais denominadas de nematocistos, localizadas na epiderme (BARNES; HUGHES, 2009). Toda a estrutura do pólipo possui uma camada de muco na superfície e um esqueleto a base de carbonato de cálcio.

O carbonato de cálcio é um importante elemento estrutural dos corais escleractíneos. Ele é secretado pelo epitélio calicoblástico (figura 1). Através deste epitélio, enquanto o coral estiver vivo, a estrutura calcária, que sustentará as colônias dos corais escleractíneos, serão formadas e poderão ser responsáveis pela estruturação de recifes (GOREAU, T. F.; GOREAU, N. I.; GOREAU, T. J., 2010; MIZRACHI et al., 2010). Os recifes de corais são as maiores estruturas biológicas marinhas do planeta e estão entre os ecossistemas biologicamente mais diversificados do mundo (CONNELL, 1978; HOEGH-GULDBERG et al., 2007; SANTOS, 2013). Segundo a *National Oceanic Atmospheric Administration* (NOAA, EUA), instituição governamental dedicada a assuntos sobre meteorologia, oceanos, atmosfera e clima, os recifes de corais aportam cerca de 800 espécies de corais calcários, além de cerca de 4.000 espécies de peixes, e centenas de outras espécies. Isto faz dos recifes um dos ecossistemas que mais suportam espécies por unidade de área, servindo como abrigo e fonte de alimento para esses organismos (Figura 2).

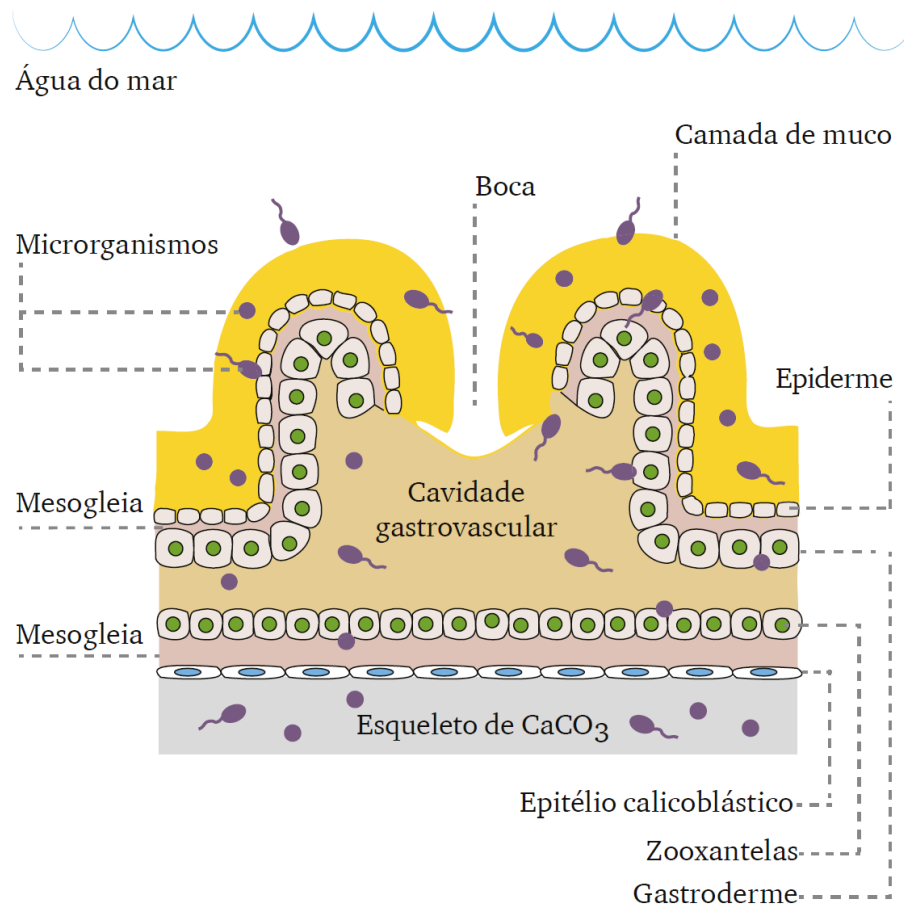


Figura 1: Esquemática de um pólipocoralino (ZILBERBERG et al., 2016).

A riqueza de espécies e funções ecológicas dos recifes chama a atenção para seu valor econômico e ecológico (COSTANZA et al., 2014; SANTOS, 2013) (Figura 3). Estimativas indicam que os recifes de coral contribuem mundialmente com mais de 36 bilhões de dólares em bens e serviços (<http://maps.oceanwealth.org/> acessado em 02 de março de 2019) e que aproximadamente 500 milhões de seres humanos dependem destes bens mundialmente (WILKINSON, 2000; LA BARRE, 2013). No Brasil, mais de 18 milhões de pessoas vivem aglomeradas na região costeira (FERREIRA; MAIDA, 2006). A saúde, o bem-estar e a sobrevivência dessas populações dependem diretamente dos ecossistemas costeiros, em especial dos recifes de coral.

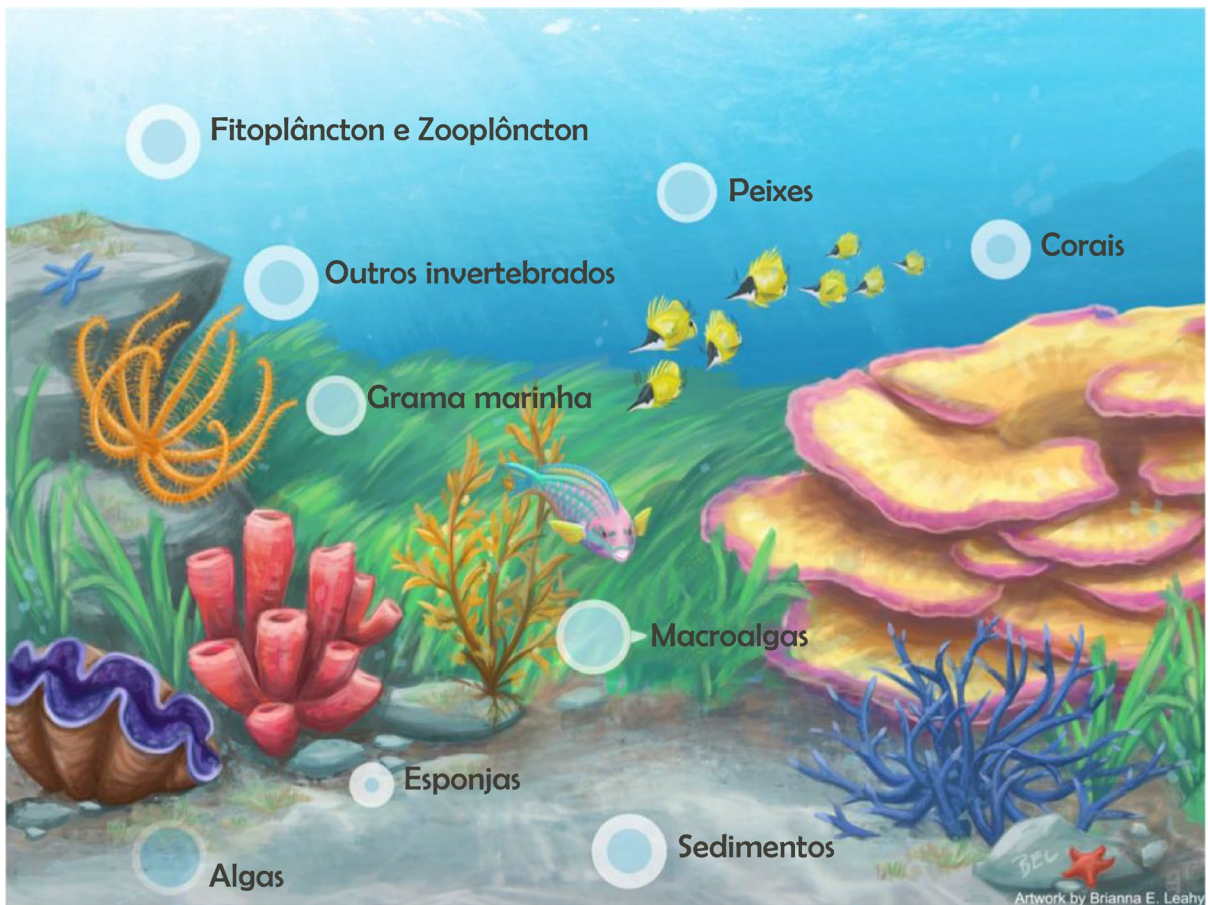


Figura 2: Ilustração da interação dos recifes de corais com outros animais marinhos (adaptado de MCDEVITT-IRWIN et al (2017) e ilustrado por Brianna E. Leahy).

Segundo Hinrichsen (1999), além da biodiversidade e da proteção costeira contra a ação das ondas e o impacto das tempestades, os serviços ecossistêmicos e benefícios prestados pelos recifes de corais (Figura 3) podem incluir diversas atividades: A alimentação e a geração de renda, fornecida através da pesca, para as comunidades costeiras que são desprovidas de recursos econômicos dado pelo governo; a produção de substâncias bioativas que podem ser extraídas de peixes, esponjas, corais e que oferecem uma matriz de produtos químicos as quais podem ser utilizadas como enxerto de ossos (SHORS, 1999), tratamento de tumores e substâncias anti-inflamatórias (VILLA; GERWICK, 2010); atividades extrativistas como a produção de joias a partir de conchas, corais e aquários ornamentais. O turismo que é considerado um dos serviços ecossistêmicos que mais crescem globalmente e que promovem o desenvolvimento

econômico das cidades costeiras fornecendo empregos e gerando rendas, através de visitas, mergulhos e pescas recreativas (MOBERG; FOLKE, 1999).

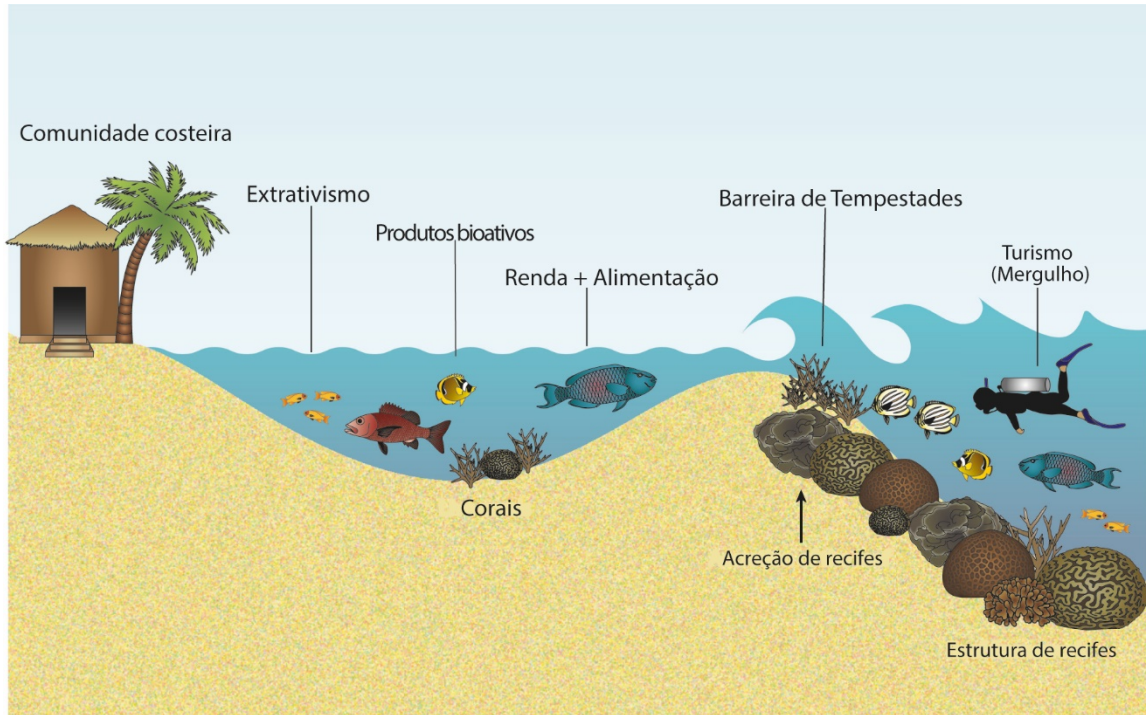


Figura 3: Ilustração de exemplos de serviços e benefícios fornecidos por ecossistemas de recifes de corais (Adaptado de BRUNO; CÔTÉ; TOTH, 2019).

Os recifes de corais de águas rasas são restritos em relação a distribuição geográfica devido a sua fisiologia. Por exemplo, os corais construtores de recifes não podem tolerar temperaturas acima de 32 °C (KINSMAN, 1964; PARSONS; LALLI, 1988; ROSADO et al., 2018), limitando a faixa de ocorrência. Outro fator importante é a quantidade de luz presente no ambiente. A maioria dos corais depende em algum nível de processos fotossintéticos. Dessa forma, são geralmente ausentes em águas bastante turvas, porque altos níveis de sedimentos em suspensão podem diminuir a profundidade na qual a luz pode penetrar (HENLEY et al., 2000). Dada essas características, a ocorrência dos corais é limitada a zonas tropicais e semitropicais (Figura 4). Além disso, a maioria dos recifes de corais pode se adaptar às diferenças na salinidade da água que pode variar de 28 a 50 g l⁻¹ (KARLSON; CORNELL, 2002; KINSMAN, 1964; PARSONS; LALLI, 1988).

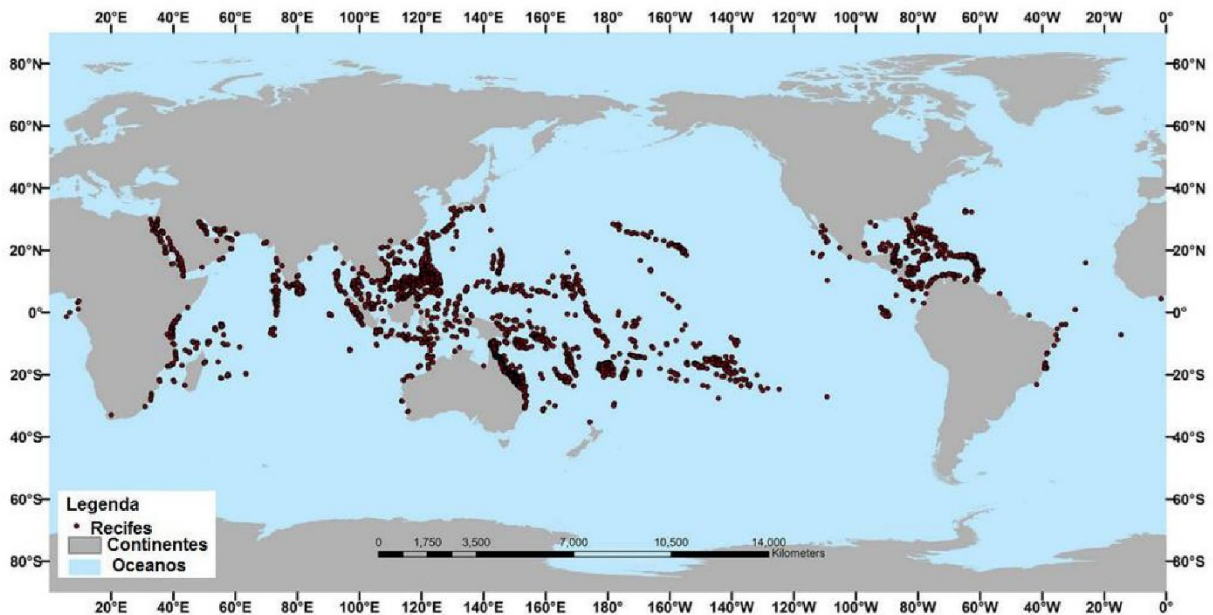


Figura 4: Distribuição mundial dos corais nas regiões tropicais e semitropicais. (Adaptado de NOAA – Website: [https:// oceanservice.noaa.gov/ education/kits/corals/media/supp_coral05a.html](https://oceanservice.noaa.gov/education/kits/corals/media/supp_coral05a.html)).

Existem duas grandes extensões recifais ao redor do mundo: a Indo-Pacífica e a Atlântica. A região Indo-Pacífica compreende a maior diversidade de espécie (cerca de 85% dos recifes de coral do mundo), sendo considerada uma das comunidades naturais mais ricas do planeta (REAKA-KUDLA, 1997, ZILBERBERG, et al 2016). Já na região Atlântica, as maiores áreas de recifes de coral são encontradas no Brasil, principalmente nos litorais da região Nordeste e em nove costões rochosos nas regiões Sudeste e Sul (GALVÃO; NOLASCO, 2013; MAIDA; FERREIRA, 1997). A fauna de coral escleractíneos brasileira possui baixa diversidade de espécies contendo vinte e oito espécies de corais e cinco espécie de hidrocorais (SOARES et al., 2017), quando comparados aos recifes australianos, e um alto grau de endemismo (MAIDA; FERREIRA, 1997). A região da costa brasileira apresenta como espécies endêmicas de corais: *Favia gravida*, *Mussismilia braziliensis*, *Mussismilia hispida*, *Mussismilia harttii*, *Mussismilia leptophylla*, *Millpeora nítida*, *Millepora braziliensis*; *Millepora laboreli* e *Siderastrea stellata* (Figura 5) (AMARAL et al., 2008; CASTRO; PIRES, 2001; LEWIS, 2006; LINTON; WARNER, 2003).

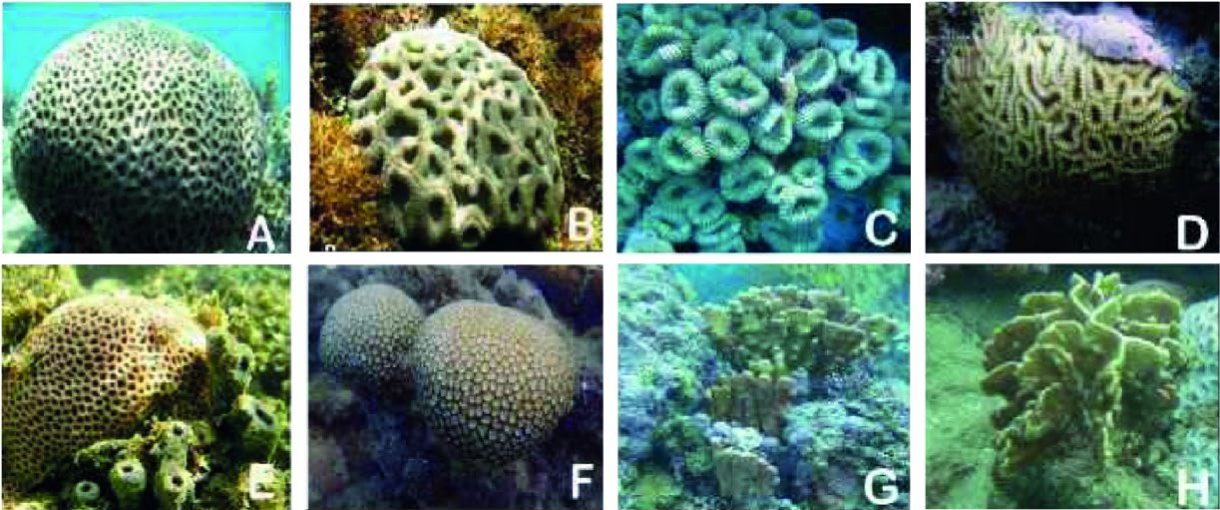


Figura 5: Corais e hidrocorais endêmicos da costa brasileira. A) *Mussismilia braziliensis*, B) *Mussismilia hispida*. C) *Mussismilia harttii*, D) *Favia gravida*, E) *Siderastraea stellata*, F) *Mussismilia leptophylla*, G) *Millepora nitida*, H) *Millepora braziliensis* (SOARES, et al, 2017; LEÃO, KIKUCHI, OLIVEIRA, 2019)

Dentre todos os corais escleractíneos, os hidrocorais do gênero *Millepora* são componentes significativos de recifes de corais e habitats similares como rochas de praia (AMARAL et al., 2008). Estes hidrocorais pertencem à família Milleporidae e à classe Hydrozoa e são conhecidos como “coral de fogo” devido às suas propriedades urticantes. Podem ser encontrados em diferentes habitats, como em águas rasas, recifes profundos e zonas de arrebenção (IGUCHI; IWANAGA; NAGAI, 2008).

Esses corais constituem os principais recifes de corais brasileiros que abrangem da costa nordeste até o Sudeste e algumas das colônias podem chegar a ter até 2 m de extensão e exceder 1 m de altura (LABOREL, J., 1969). O gênero *Millepora* possui 17 espécies reconhecidas espalhadas pelo oceano Índico, Centro-Pacífico, Oeste-Pacífico e oceano Atlântico (LEWIS, 1989; LEWIS, 2006; RUIZ-RAMOS, WEIL, SCHIZAS, 2014) Na costa brasileira foram identificadas 4 espécies de *Millepora*: *M. alcicornis*, *M. nítida*, *M. braziliensis* e *M. laboreli* (AMARAL, 2008).

Juntamente com outras espécies de hidrocorais, *Millepora alcicornis* é considerado um importante construtor das bordas dos recifes do Brasil devido a sua grande estrutura de calcário (LEÃO; OLIVEIRA; KIKUCHI, 2008; WIRTZ; ZILBERBERG, 2019) (Figura 5). Elas podem ser encontradas em diferentes profundidades, de até cinquenta metros de profundidade (LEWIS, 2006). Essa espécie está presente no Mar do Caribe, no Golfo do México, Flórida, Cabo Verde, Ilhas canárias (Espanha), Ilha da

Madeira (Portugal) e Brasil (CLEMENTE et al., 2011; LABOREL, 1974; WIRTZ; ZILBERBERG, 2019). Em relação a sua morfologia, a coloração é definida como castanho claro com as pontas branqueadas (Figura 6). Em sua superfície, há tentáculos similares à pelos, que são cobertos de cnidoblastos que liberam cnidócitos para imobilizar a presa que é digerido pelos pólipos microscópicos (LEWIS, 2006). Sua reprodução pode ser sexuada, assexuada, através da brotação e do desprendimento de fragmentos, que originam indivíduos geneticamente iguais à colônia original (GATES; EDMUND, 1999; LEWIS, 2006).



Figura 6: Colônia do hidrocoral *Millepora alcicornis* (WIRTZ; ZILBERBERG, 2019; <https://www.livingoceansfoundation.org>)

1.2. Microbiologia dos corais

Os micro-organismos são componentes biológicos essenciais da maioria dos organismos vivos (ROSENBERG, 2009). Esses micro-organismos colonizam toda a constituição anatômica dos corais, principalmente na camada de muco (rica em polissacarídeos, proteínas e lipídeos) e a água circundante (COSTANZA et al., 1997;

WILD et al, 2004; SHARON; ROSENBERG, 2008). Por meio do processo de co-evolução, foram desenvolvidos entre os micro-organismos e o hospedeiro relações simbióticas, as quais, atualmente são bem estabelecidos, como a modulação da saúde dos corais que está diretamente relacionada à sua composição microbiana (ROSENBERG, 2009).

Os micro-organismos associados realizam diversas funções potencialmente benéficas, como: proteção contra patógenos, ciclagem de nutrientes (como os compostos nitrogenados) e síntese de metabólitos como o dimetilsulfonopropionato (DMSP), que aumenta a disponibilidade de enxofre e contribui para a formação de nuvens (ROSENBERG, 2009; COLOMBO-PALLOTA, RODRÍGUEZ ROMÁN; IGLESIAS-PRIETO, 2010; LEMA; WILLIS; BOURNEB, 2012; RAINA et al., 2013; SWAN et al., 2017).

Segundo a Teoria do Holobionte (postulada a partir dos estudos com a microbiologia dos corais) a predisposição dos organismos dentro de um ambiente é baseada na interação simbiótica entre os organismos vivos e os micro-organismos transmitida entre gerações. O conceito do coral holobionte permite compreender como as associações entre os grupos que compõem o holobionte beneficiam-se uns aos outros. Em um sistema dinâmico, as associações proporcionam uma maior capacidade adaptativa, cujos membros oscilam dependendo das condições ambientais e necessidades diárias (SHASHAR; COHEN; LOYA, 1993; TANNER, 1996; GATES; AINSWORTH, 2011; LEMA; WILLIS; BOURNEB, 2012). Entretanto, quando há alguma perturbação ou deslocamentos em um dos organismos, o holobionte pode ser afetado, com possíveis danos para a saúde do hospedeiro. Neste caso, é possível que ao longo da evolução esta interação desenvolva mecanismos que irão gerar respostas químicas de sinalização para sobrevivência do holobionte (AINSWORTH, T. D.; HOEGH-GULDBERG, 2009; LITTMAN; WILLIS; BOURNE, 2009; THOMPSON, et al., 2015).

Os simbiotes podem auxiliar na adaptação, e na evolução do hospedeiro (ROSENBERG, 2009). Esta associação em escala de tempo possivelmente contribui para a mudança do genoma do hospedeiro, assim como o seu respectivo microbioma. Este processo é descrito como teoria da evolução do hologenoma (ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011). Esta teoria mostra a grande importância dos micro-

organismos na sobrevivência e evolução dos corais, no equilíbrio dinâmico do holobionte e, conseqüentemente, dos ecossistemas marinhos em geral.

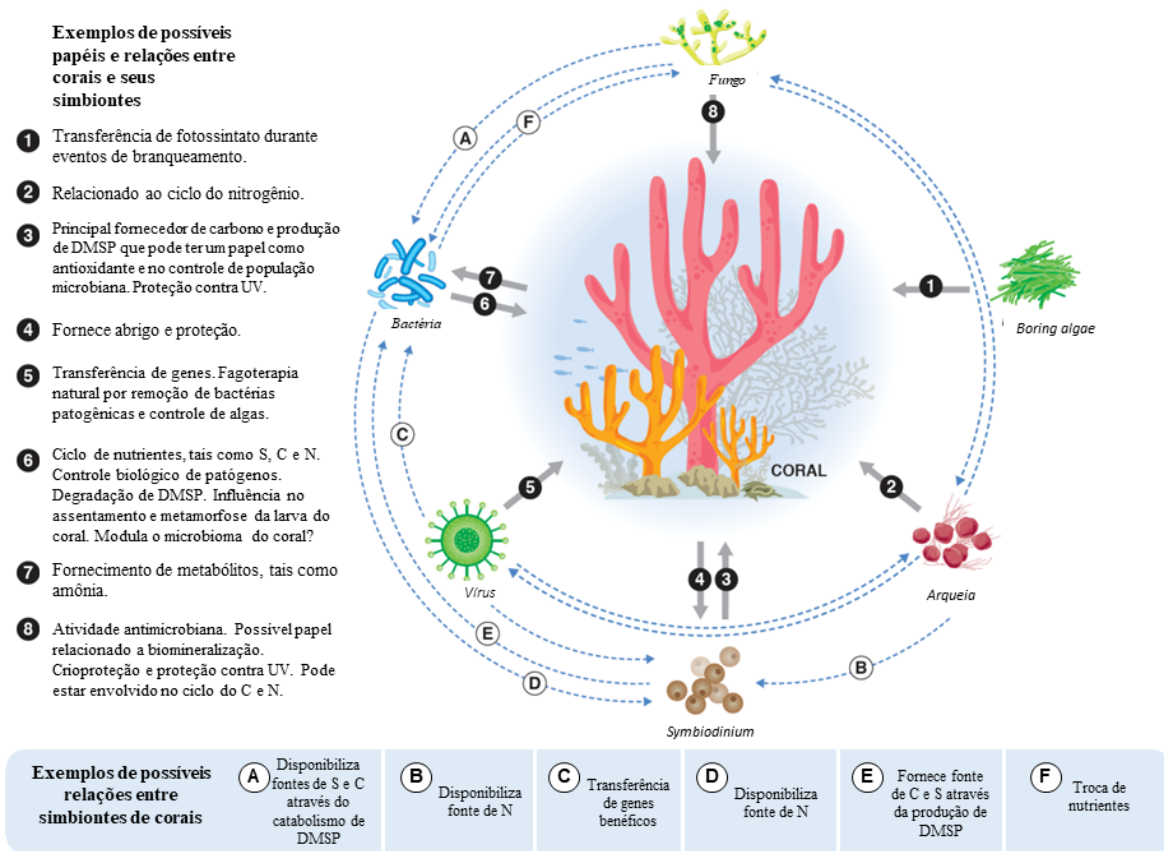


Figura 7: Representação da relação do coral com outros micro-organismos e suas respectivas funções (adaptada de PEIXOTO et al., 2017).

O coral holobionte é composto do cnidário e seus micro-organismos associados constituídos por bactérias, arqueias, fungos, vírus e protistas incluindo as microalgas fotossintéticas simbióticas do gênero *Symbiodinium* (CEH et al., 2013; THOMPSON et al., 2015). Estas, são conhecidas popularmente como microalgas fotossinteticamente ativas e, através da fotossíntese liberam compostos orgânicos para os corais, como o glicerol, para a nutrição do coral e para auxiliar na formação do esqueleto, no processo de calcificação (WEBER; MEDINA, 2012). Em contrapartida, as microalgas sobrevivem e crescem utilizando os produtos gerados pelo metabolismo do coral, como gás carbônico e compostos nitrogenados (CEH et al., 2013; RÄDECKER et al., 2015; VERBRUGGEN; TRIBOLLET, 2011). Outras vantagens dessa relação simbiótica é que os corais conferem às microalgas abrigo, proteção contra predadores e alimentação

(ROSENBERG, 2009). Nesta relação, estas microalgas podem fornecer cerca de até 95% das necessidades energéticas do hospedeiro através do carbono fixado na fotossíntese (PEARSE; MUSCATINE, 2007; GATES; AINSWORTH 2011).

As comunidades de bactérias que habitam os corais também diferem do bacterioplâncton presente na água circundante (ROSENBERG, 2009; ROHWER; YOULE, 2010). Ademais, as comunidades bacterianas associadas com corais são, em grande parte, espécie específicas, com perfis microbianos que refletem relações filogenéticas entre as espécies de corais. Diversos gêneros, tais como *Bacillus*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Shewanella*, *Paracoccus* e *Endozoicomonas* tem sido relatado em corais (BOURNE; MUNN, 2005; CEH et al., 2013; POLLOCK et al., 2018; RADJASA et al., 2008). Geralmente, o filo Proteobacteria é o mais representativo nessas comunidades bacterianas (LAWLER et al., 2016). Algumas das bactérias presentes nos corais são comensais ou patogênicas, sendo que muitas delas modificam o seu papel de acordo com as condições ambientais (GARREN; AZAM, 2012; LAWLER et al., 2016; ROSENBERG et al, 2007).

As comunidades microbianas, no entanto, são extremamente susceptíveis às mudanças no meio ambiente (ROSENBERG, 2009). O estudo da biodiversidade microbiana em seu habitat natural ou modificado tem proporcionado novos conhecimentos sobre suas interações e funções ecológicas (GIOVANNONI; STINGL, 2005), visto que quando ocorrem perturbações externas, estas comunidades podem ser alteradas tanto em relação a diversidade biológica quanto funcional durante longos períodos de tempo (AINSWORTH et al., 2011). Estas mudanças podem gerar uma alteração do microbioma tornando o coral suscetível ao branqueamento, que é caracterizado quando o coral perde sua coloração devido à interrupção da relação simbiótica com as microalgas do gênero *Symbiodinium* (comumente denominadas também de zooxantela), que conferem cor ao coral (ROSENBERG, 2009).

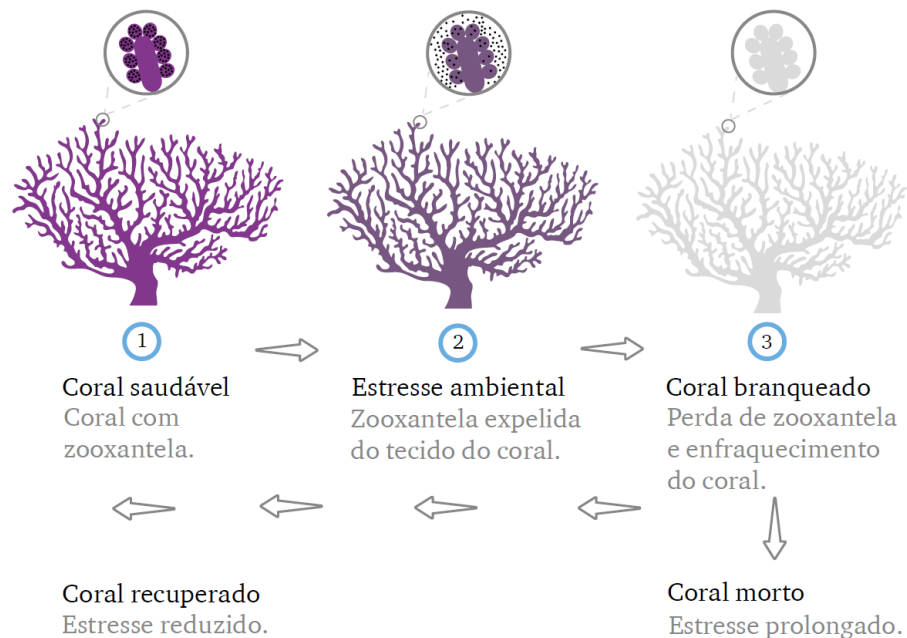


Figura 8. Esquemática do processo de branqueamento dos corais.

A comunidade bacteriana pode iniciar o processo de alteração quando os corais estão no início do processo de branqueamento (ROSENBERG; KELLOGG; ROHWER, 2007; RITCHIE; SMITH, 2013). Contudo, perante as mudanças ambientais o microbioma pode alterar e comprometer a saúde dos corais através dos micro-organismos oportunistas, mas também ajudar o hospedeiro a se adaptar as novas condições. Reshef e colaboradores (2006) postula a hipótese do coral probiótico que sugere que o microbioma pode ser modulado para melhorar a saúde e auxiliar na resiliência dos corais. Peixoto e colaboradores (2017) sugeriram o termo “Micro-organismos Benéficos para Corais” (BMC – do inglês *Beneficial Microorganisms for Corals*) para os micro-organismos simbiotes que promovem a manutenção da saúde dos corais. Este trabalho sugeriu a possibilidade de manipulação dos micro-organismos que podem promover algum benefício para a saúde do coral e a possível elaboração de um consórcio para posterior aplicabilidade em corais com a saúde comprometida.

Não há relatos na literatura sobre a influência de micro-organismos como fungos e vírus no papel de simbióticos do hidrocoral *M. alricornis*. Mas, segundo Santos e colaboradores (2016) alguns gêneros de cianobactérias como *Anabaena* sp. e

Prosthecochloris sp. podem ser considerados potenciais patógenos por estarem relacionados com doenças ou serem micro-organismos oportunistas do estado debilitado da *M. alcicornis* presente na costa brasileira. Além disso, Lewis (2006) relatou que a simbiose das microalgas fotossintéticas com a *M. alcicornis* fornece oxigênio e matéria orgânica suprindo cerca de 70-95 % da necessidade do hidrocoral.

Dentro desse contexto, é crucial compreender o papel de cada grupo de micro-organismos simbióticos, bem como entender quais grupos podem contribuir para a saúde desses animais e quais podem ser potenciais patógenos quando as condições ambientais normais, não se encontram favoráveis (MARCHESI; RAVEL, 2015; ROSENBERG; ZILBER-ROSENBERG, 2011).

Micro-organismos podem ter o papel de prever as condições de saúde e comportamento dos organismos e dos ambientes em que eles habitam. Algumas espécies toleram de forma moderada a variabilidade ambiental em relação as condições químicas, físicas e biológicas (DOUGLAS, 1995). Com isso, pode-se avaliar a qualidade ambiental e as possíveis alterações com o passar do tempo de acordo com o comportamento de dadas espécies.

Os maiores responsáveis por impactos no ambiente marinho, atualmente, são as atividades antropogênicas. Alguns micro-organismos marinhos possuem a capacidade de indicar desde a presença do contaminante no ambiente até a recuperação deste ambiente perante a esses impactos. Segundo Valavi e colaboradores (2010), a complexidade e variedade de ecossistemas de recifes de corais faz com que o uso de micro-organismos como indicadores seja recomendado para avaliar a qualidade do ecossistema marinho, em paralelo com os parâmetros físicos e químicos, devido à sua distribuição na água do mar. No caso de ambientes marinhos contaminados por derramamento de petróleo pode ocorrer o aumento da biomassa de algumas espécies bacterianas relacionada a degradação do óleo e que podem ser utilizadas como indicadora da presença do óleo, uma vez que os micro-organismos possuem vias metabólicas para a degradação de compostos orgânicos petrogênicos (CAPPELLO et al., 2007; VARJANI, 2017). Entretanto, não há relatos na literatura sobre a identificação de bactérias como indicadoras da contaminação causada por dispersantes químicos em ambientes recifais.

Para que um micro-organismo seja considerado bioindicador, ele deve responder à presença do contaminante, seja aumentando ou reduzindo sua abundância em função do mesmo (CARUSO et al., 2004; COOPER; GILMOUR; FABRICIUS, 2009). Bioindicadores microbianos têm sido identificados em regiões contaminadas com petróleo. Em estudo realizado em ambientes costeiros na Nigéria, por exemplo, a ausência de espécies do gênero *Chormatium*, indica que o ambiente está contaminado com óleo (ESSIEN; ANTAI; OLAJIRE, 2009). Em manguezais brasileiros, foi observado que as comunidades microbianas podem refletir a variação espacial de substâncias químicas nos sedimentos, com micro-organismos do filo Betaproteobacteria associados com regiões contaminadas com hidrocarbonetos totais do petróleo e bactérias do filo Actinobacteria relacionadas com poluição por antraceno e outros hidrocarbonetos aromáticos. Gêneros bacterianos como *Marinobacter* e *Cycloclasticus* também foram descritos como bioindicadores do impacto por petróleo em manguezais. Nestes casos, estes grupos aumentaram na presença do poluente e foram indicados como possíveis alvos para o biomonitoramento do impacto do petróleo nestes ambientes (SANTOS et al., 2011).

Os bioindicadores não estão restritos somente a uma única espécie de bactéria com uma certa tolerância limitada, mas estes podem ser formados por uma comunidade bacteriana abrangendo uma gama de tolerâncias moderadas ambientais, representando um conjunto de informações que servirão para avaliação do ambiente marinho.

A estrutura do microbioma associado ao coral reflete o resultado do desequilíbrio da homeostase frente aos impactos, como o derramamento de óleo. Esses estressores ambientais podem induzir mudanças na composição do microbioma e afetar as funções benéficas dessa associação com o hospedeiro a ponto de serem perdidas (MCDEVITT-IRWIN et al., 2017). Portanto, o estudo do microbioma dos corais pode ajudar a compreender o impacto desses agentes no coral e indicar quais são os mais propensos e os mais resistentes aos estressores antropogênicos.

1.3. Ameaças antrópicas aos ambientes coralíneos

Os ecossistemas recifais têm sido alvo de grandes impactos causados, principalmente, por ações antrópicas. Por serem organismos extremamente sensíveis mesmo à pequenas mudanças ambientais, esses impactos têm sido responsáveis pela grave e duradoura devastação desses ambientes (LESSER, 2007). Estas ações podem estar associadas a diversas atividades, como o turismo por meio do tráfego de embarcações e má orientação aos turistas; a exploração extrativista dos organismos que habitam os recifes; pesca predatória e desenvolvimento urbano desenfreado próximo às zonas costeiras, culminando no aumento da população gerando, assim, uma maior emissão de esgoto (DUTRA; KIKUCHI; LEÃO, 2000). Somados a isso, há o impacto de processos globais, tal como as mudanças climáticas e acidificação dos oceanos (ALLEMAND; OSBORN, 2019; BAKER, 2003; HOEGH-GULDBERG, 1999). Segundo o relatório revisado *Reef at Risk* (BURKE, et al 2011) do Instituto Mundial de Recursos (do inglês *World Resources Institute - WRI*), estima-se que 30% das áreas de recife já foram degradadas irreversivelmente e que mais de 90% serão ameaçados por ações antropogênicas até 2030. Essas ações expõem o ecossistema a impactos crônicos e agudos, contribuindo para o declínio dos corais formadores de recifes (LESSER, 2007). As consequências dos impactos podem aumentar em gravidade, caso estes ecossistemas não sejam prontamente protegidos, de modo que a conservação dos corais é um desafio global (WEST; SALM, 2003; BELLWOOD et al., 2004; HUGHES et al., 2017).

Atualmente, os impactos nos corais são avaliados, basicamente, através da observação de danos no esqueleto, da perda de pigmentação e de tecidos dos corais, mudanças na composição das comunidades microbianas, surgimento de doenças, diminuição da diversidade de espécies, redução da reprodução, recrutamento e, finalmente, através da morte desses organismos (RICHMOND, 1993; DUBINSKY; STAMBLER, 1996; HUGHES; CONNELL, 1999; LEWIS, 2006; SANTOS, et al 2015).

1.3.1. Poluição causada por derramamento de óleo

Uma das ações antrópicas que causa grande preocupação, principalmente em relação à sustentabilidade ambiental marinha, é a exploração petrolífera que pode ocasionar acidentes com derrames de petróleo. A poluição química por hidrocarbonetos de petróleo tem um efeito negativo sobre os ecossistemas marinhos podendo causar intoxicação química devido a rápida incorporação das frações hidrossolúveis sobre os recifes de corais (LOYA; RINKEVICH, 1979). O estresse provocado pelo óleo pode prejudicar muitas funções biológicas, como reprodução, metabolismo, além de ter efeitos histológicos, comportamentais e de desenvolvimento, e em casos mais crônicos, levar à morte do coral (EPSTEIN; BAK; RINKEVICH, 2000; LOYA; RINKEVICH, 1979). Neste contexto, os corais localizados na região Sudeste do Brasil estão sobre sério risco, uma vez que as regiões de exploração de petróleo se encontram próximas a regiões coralíneas, como por exemplo, a cidade de Búzios que é próxima a Bacia de Campos, ambas localizadas no estado do Rio de Janeiro, Brasil (Figura 9).



Figura 9: Localização da província petrolífera no Sudeste da costa brasileira próxima à Armação dos Búzios (<https://lucastchermenko.blogspot.com/p/a-farsa-do-pre-sal.html>).

Desde a revolução industrial, em meados do século XVIII, a produção e o uso de energia mudaram drasticamente o modo de produção e consumo no mundo. O impulsionador dessa revolução foi o carvão mineral, que posteriormente deu lugar ao petróleo após a metade do século XX. Até os dias de hoje, o petróleo se mantém como a principal matriz energética do nosso planeta, além de ser considerado grande contribuidor na economia de diversos países (TERRA; COELHO, 2005). O petróleo é constituído por uma mistura complexa de compostos orgânicos contendo mais de 17.000 componentes distintos que podem variar em função das condições físicas, químicas e biológicas e da localização geográfica de origem (CAPPELLO et al 2012; HAAPKYLÄ; RAMADE; SALVAT, 2007).

O petróleo é derivado de restos de animais aquáticos e plantas acumulados durante milhões de anos que foram se decompondo e dando origem ao petróleo. Este, no entanto, migrou para as rochas porosas e permeáveis transformando-as em grandes reservatórios (SPEIGHT, 2014). A composição do petróleo abrange uma ampla diversidade de compostos químicos, mas os principais são os hidrocarbonetos que são compostos por carbono e hidrogênio e que apresentam dezenas de variações na estrutura molecular. Podem variar desde uma estrutura de cadeia simples, como as parafinas, por exemplo, até estruturas em forma de anel, como os naftenos e aromáticos (SPEIGHT, 2014). Os hidrocarbonetos, como alifáticos, n-alcanos e aromáticos, perfazem 97% da maior parte do petróleo (NRC, 2003). Dentre esses compostos, os aromáticos estão entre os mais estáveis e podem persistir no meio ambiente por longos períodos.

O óleo é uma mistura de compostos solúveis e insolúveis. Uma parte do óleo que passa pelo processo de dissolução na coluna d'água é comumente chamado de "Fração solúvel do óleo, em inglês, *Water-Soluble Fraction* – oWSF" e pode ser definido como "solução monofásica composta por moléculas dissolvidas individualmente e isenta de qualquer emulsão coloidal", segundo Bobra (1992). Mesmo que esta fração seja considerada pequena quando comparado com a massa total do óleo, quando em contato com organismos pode ser considerada tóxica (BOBRA, 1992).

A composição da fração solúvel do óleo vai depender de diversos fatores, como: composição do óleo, propriedades da água e os fatores de intemperismo (SPEIGHT, 2014).

A partir do petróleo bruto, vários produtos petrolíferos são sintetizados, tais como: combustíveis, plásticos, detergentes, borrachas, medicamentos, fertilizantes, entre outros (TERRA; COELHO, 2005; SABOURIN; SILLIMAN; STRYCHAR, 2012). Além disso, é considerado abundante, de alta densidade energética e extremamente versátil em sua utilização final (GIEG; SUFLITA, 2014). Os diferentes tipos de petróleo bruto possuem propriedades químicas e físicas que afetam sua susceptibilidade à degradação no ambiente (HEAD; JONES; RÖLING, 2006).

Apesar do benefício econômico mundial, há uma preocupação ecológica relacionada aos acidentes, que envolvem derramamentos de óleo (XU; LU, 2010). No Brasil, estes incidentes são causados principalmente pela exploração do petróleo realizada em alto mar, conhecida como exploração *offshore* (Figura 10). Esta tecnologia tende a tornar os projetos onerosos, além de estar atrelado a um maior risco ambiental, pois a extração ocorre em lâminas d'água cada vez mais profundas (GANDRA, 2006).



Figura 10: Diversas plataformas offshore utilizadas atualmente (<http://www.boemre.gov/tarprojectcategories/structur.html>)

Durante as últimas décadas, grandes volumes de óleo foram liberados no ambiente marinho, através de acidentes relacionados com vazamentos de oleoduto, tanques de armazenamento e outros derramamentos acidentais (ALBAIGÉS; KIENHUIS; DAHLMANN, 2015). Um dos maiores exemplos foi o acidente ocorrido na plataforma *Deepwater Horizon* localizada no Golfo do México, devido a uma explosão que ocorreu em abril de 2010, quando foram liberados cerca de 779 milhões de litros de óleo no mar, a uma profundidade de 1500 metros (SCHEDLER et al., 2014). No Brasil, um dos acontecimentos mais recentes ocorreu no ano de 2011, na Bacia de Campos, com vazamentos em fendas que surgiram no leito marinho próximo ao local onde a empresa petrolífera Chevron realizava perfurações. Este acidente resultou no vazamento de cerca de 3.700 barris de petróleo (Figura 11).



Figura 11: Vazamento de óleo no Campo de Frade- RJ. (<https://www.wwf.org.br>).

Grandes derramamentos, normalmente, são bem divulgados, entretanto, vazamentos menores ocorrem com uma maior frequência e, na maioria das vezes, não são documentados. Apesar de serem de pequena proporção, esses vazamentos, quando considerados em conjunto, são impactantes aos ecossistemas marinhos (ATLAS; HAZEN, 2011). Segundo Santos e colaboradores (2016), anualmente o aporte de hidrocarbonetos petrogênicos nos oceanos é de cerca de $2,35 \times 10^6$ toneladas e as

principais rotas de transporte do petróleo (Figura 12) ocorrem em locais que possuem recifes de corais ou nas proximidades, sendo o transporte também considerado um risco para o ecossistema coralíneo.

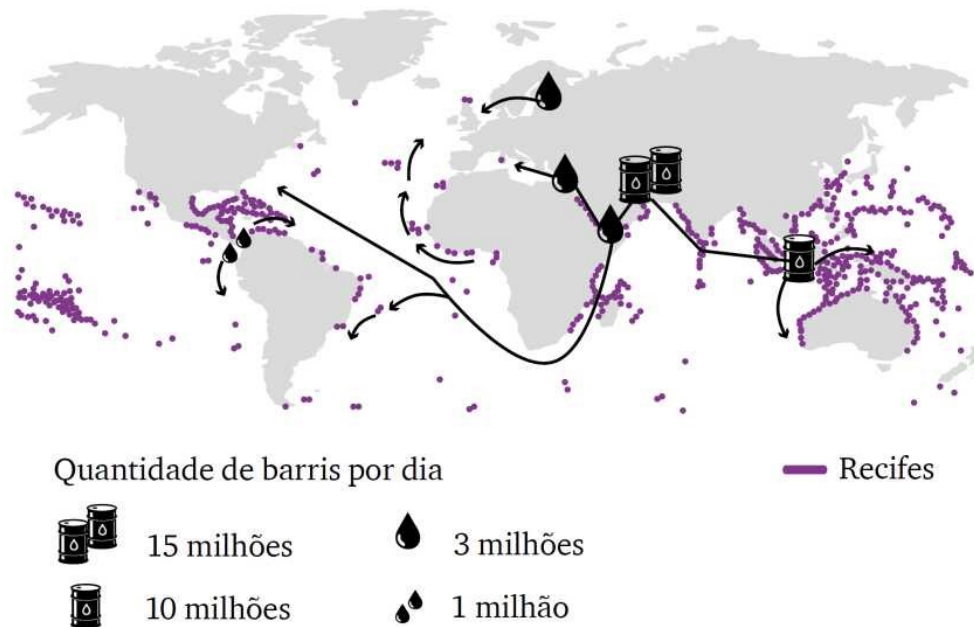


Figura 12: Localização dos recifes de coral ao redor do mundo e as principais rotas de transporte do petróleo nos oceanos.

Alguns compostos do petróleo como os hidrocarbonetos alifáticos e especialmente os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) são considerados recalcitrantes, tendo efeitos nocivos sobre meio ambiente por serem potencialmente tóxicos, mutagênicos ou carcinogênicos (ABDEL-SHAFY; MANSOUR, 2016).

Esses compostos, assim como outros compostos tóxicos, são responsáveis por diversos danos no ambiente coralíneo, como a mortalidade e o aumento da incidência de doenças nos corais (LOYA; RINKEVICH, 1979). Esses danos podem ocorrer de forma direta, por meio da toxicidade, ou indireta. Exemplos de impactos de óleo incluem a produção excessiva de muco devido à reação ao estresse (WHITE et al., 2012), redução nas taxas de crescimento, redução das populações de microalgas fotossintéticas simbióticas, o que pode causar o branqueamento (HARRISON *et al.*, 1990; KO et al. 2014), diminuição no assentamento e desenvolvimento de larvas de coral (GOODBODY-GRINGLEY et al.,

2013) e mudanças na composição do microbioma de corais (SANTOS et al., 2015), entre outros. Estudos de longo prazo em corais cronicamente impactados por óleo têm demonstrado que a recuperação desses ambientes é muito lenta e pode durar muitas décadas (LOYA; RINKEVICH, 1979; EPSTEIN; BAK; RINKEVICH, 2000). Além dos corais, o óleo pode também afetar inúmeros outros organismos que vivem nos recifes, como plantas, peixes e vários invertebrados (YENDER; MICHEL, 2010).

Portanto algumas estratégias tecnológicas de remediação são projetadas para mitigar essa perturbação e desequilíbrio tanto no coral quanto nas espécies que vivem neste habitat.

1.4. Métodos de remediação do ambiente marinho contaminado por óleo

A preocupação associada aos danos causados pelos incidentes de derramamento do petróleo levou ao desenvolvimento de técnicas para mitigar a contaminação do óleo (VILLA; GERWICK, 2010). Os métodos de remediação utilizadas pelas companhias petrolíferas classificam-se em função do principal mecanismo de ação em remediações físicas, térmica, químicas e biológica (Figura 13).

Os métodos físicos podem ser caracterizados pela utilização de:

a) *Barreiras de contenção*: São utilizadas na superfície da água e impedem o espalhamento do óleo. Além disso, direciona a mancha para locais de fácil recolhimento, evitando a poluição de áreas de interesse ecológico e o possível contato com a área costeira (JERNELÖV; LINDÉN, 1981). Esse método possui limitações devido aos fatores de intemperismo do mar (correnteza e ondas) que reduz a eficiência desse método;

b) *Skimmers*: São equipamentos que, através da sucção, removem o óleo da água que foi cercado pelas barreiras de contenção. As limitações deste método se devem no ato de sucção do óleo a qual este vem acompanhado da água. Este processo se torna oneroso pelo fato de ao final da coleta ter que realizar o procedimento de separação do óleo e água, além do fato de que ao sugar a água diminui a capacidade de

armazenamento do óleo no equipamento (JERNELÖV; LINDÉN, 1981; NORDVIK et al., 1996; BAYAT et al., 2005);

c) *Materiais absorventes e adsorventes*: São utilizados para absorver e/ou adsorver pequenas quantidades de óleo, com a vantagem de não absorverem água. Estes podem ser reutilizados e são recomendados no estágio final de recolhimento do óleo ou em pequenos derrames (BAYAT et al., 2005; JERNELÖV; LINDÉN, 1981).

O método térmico é baseado na queima *in situ* do petróleo de forma controlada no local, do derramamento, com o intuito de reduzir o óleo da superfície. Entretanto, a queima gera resíduos que podem incorporar na coluna d'água e causar danos ao ecossistema marinho dificultando a recuperação do contaminante no mar.

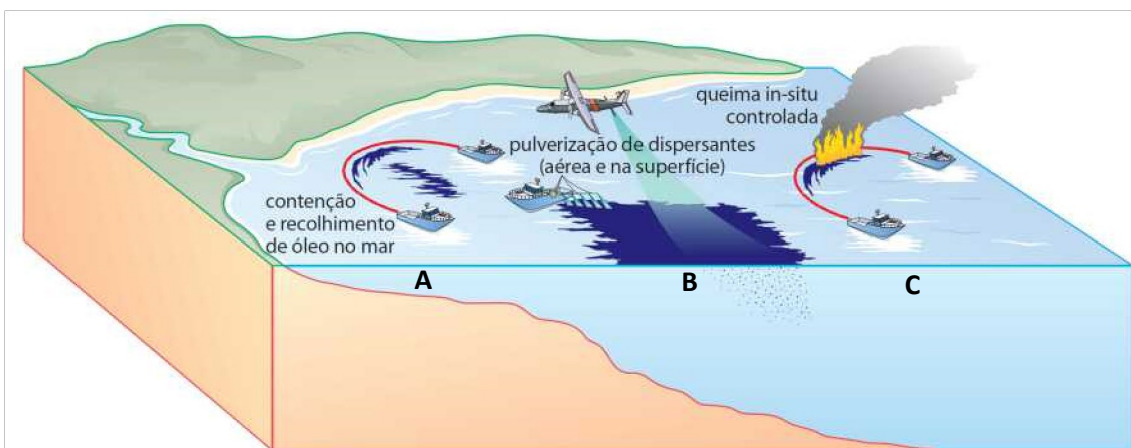


Figura 13: Métodos de remediação: A) Físicos (uso de barreiras de contenção, skimmers, materiais absorventes e adsorventes); B) Químicos (uso de dispersantes); C) Térmico (queima in situ do petróleo de forma controlada).

Apesar da grande importância, os métodos físicos possuem eficiência limitada quando os vazamentos de óleo são de grandes proporções. Por isso, eles são aplicados de forma conjunta com métodos químicos e biológicos. Dada importância destes métodos para o presente estudo, eles serão abordados de forma mais profunda a seguir.

1.4.1. Remediação biológica

A remediação biológica, também denominada de biorremediação, é baseada na exploração direta ou indireta da atividade metabólica de organismos vivos para degradar, modificar ou mineralizar compostos orgânicos tóxicos, transformando-os em substâncias com pouca ou nenhuma toxicidade (MORTAZAVI et al., 2013; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009; SANTOS et al., 2011; XU; LU, 2010). A técnica de biorremediação constitui uma alternativa segura e eficaz na descontaminação de ambientes poluídos por petróleo, focando não apenas na eliminação do contaminante, mas na recuperação da saúde dos organismos presentes no local (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009). Santos (2013) desenvolveu o único trabalho que avaliou o impacto do óleo sobre o coral *Mussismilia harttii* e a utilização de um consórcio microbiano biorremediador para proteger o coral contra os efeitos do óleo. Os pesquisadores concluíram que a eficiência da degradação de hidrocarbonetos totais do petróleo (HTP) pelas bactérias degradadoras de óleo aumentou em 40%, mostrando ser uma alternativa eficaz e promissora.

Existem diversas estratégias de biorremediação utilizadas atualmente, dentre elas, as mais bem caracterizadas: bioestímulo e bioaumento. O bioestímulo consiste no processo de manipulação do ambiente de modo que a comunidade microbiana seja estimulada, otimizando suas condições de crescimento através da adição de nutrientes, fontes de carbono, entre outros (MERCER; TREVORS, 2011; PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009). Como no processo de contaminação ocorre a entrada de uma quantidade discrepante de carbono, isso dificulta bastante a incorporação do excesso de carbono que se concentra no ambiente caso não seja utilizado por micro-organismos como fonte de energia (MORGAN, 1989; ALBAIGÉS; KIENHUIS; DAHLMANN, 2015; GRAHAM et al., 2010). Uma alternativa para se aumentar a eficiência dos processos de biorremediação consiste na prospecção de micro-organismos que possuam a capacidade de degradar determinados contaminantes. Este processo é denominado de bioaumento.

Após o isolamento e a seleção desses micro-organismos, eles podem ser multiplicados em laboratório para posterior inoculação no ambiente a ser biorremediado. O bioaumento pode utilizar micro-organismos do local impactado, considerando a

metodologia mais adequada, devido a adaptação das espécies selecionadas as condições ambientais do local impactado, por serem mais resistentes as variações ambientais, menos suscetíveis a variações genéticas causadas por estresse no meio e mais segura, já que não há a introdução de organismos exógenos (GENTRY; RENSING; PEPPER, 2004; THOMPSON et al., 2005; DA SILVA; ALVAREZ, 2009; CERQUEIRA et al., 2014).

A degradação dos hidrocarbonetos ocorre de forma mais eficaz quando é realizada por um consórcio de micro-organismos, cada um sendo responsável em degradar uma ou várias frações do óleo. Estes irão, então, criar substratos para o crescimento de outros micro-organismos podendo chegar à mineralização completa do poluente em função da complementaridade metabólica entre seus membros (VARJANI, 2017).

Além disso, apresentam baixo custo de implementação e menor risco ambiental. (OLIVEIRA; LEÃO; KIKUCHI, 2013). Santos e colaboradores (2015) avaliaram o impacto de um derramamento de óleo e o uso da biorremediação em corais, mostrando que a biorremediação promoveu a degradação das frações solúveis do óleo e melhorou a saúde do coral através de propriedades probióticas.

Bactérias, leveduras e fungos apresentam a capacidade de degradação de grandes variedades de diferentes compostos orgânicos, como os encontrados em efluentes de refinarias e indústrias, utilizando essas substâncias como fonte de carbono e energia. Por isso, esses micro-organismos vêm se apresentando como uma alternativa no tratamento de contaminantes, sendo de grande importância na resolução de problemas ambientais (CERNIGLIA; SUTHERLAND, 2010). Dessa forma, durante o processo de biorremediação, os micro-organismos transformam hidrocarbonetos em compostos intermediários. Esses compostos serão utilizados como fontes de carbono e energia para o crescimento microbiano e assim aceleram o processo de descontaminação do ambiente, levando em conta os benefícios de menor custo e menor dano ambiental (PANDEY; CHAUHAN; JAIN, 2009).

As bactérias são provavelmente uma das maiores responsáveis pela biodegradação de hidrocarbonetos e podem ser encontradas em ambientes marinhos (incluindo corais, esponjas, algas e sedimentos), dulcícolas e no solo. E são muitos os

gêneros conhecidos por utilizarem hidrocarbonetos como única fonte de carbono (PRINCE; AMANDE; MCGENITY, 2018), sendo que *Achromobacter*, *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Pseudomonas*, *Vibrio* e *Micrococcus* são bastante conhecidos (LEAHY; COLWELL, 1990). As abordagens envolvendo o isolamento de micro-organismos podem fornecer insumos para a biotecnologia ambiental, tendo como principal diretriz a bioprospecção. Essa, por sua vez, pode ser definida como a avaliação e exploração sistemática da diversidade da vida existente em determinado ambiente para fins comerciais, ou seja, a busca por genes e/ou organismos de interesse biotecnológico, seja na indústria ou na recuperação de ambientes impactados (PEIXOTO; VERMELHO; ROSADO, 2011). A variedade de aplicações dos produtos biotecnológicos está se expandindo com o passar do tempo, principalmente no ramo de tecnologia utilizando microbiomas (TIMMIS, et al, 2017). Por esse motivo, observa-se um aumento no percentual desses produtos no mercado, incluindo constantes lançamentos de fármacos, cosméticos, enzimas, corantes, bioinseticidas, biossurfactantes, biopolímeros, e outros, além dos processos microbianos, como biorremediação e promoção de crescimento vegetal cada vez mais empregados.

1.4.2 Remediação química

Quando a remoção do óleo não é possível somente por métodos físicos, o uso de remediação química pode ser eficaz e rápido para remover o óleo flutuante. Neste método, os dispersantes são produtos químicos pulverizados sobre a mancha de óleo através de navios ou embarcações.

Segundo a Associação Internacional de Conservação Ambiental da Indústria do Petróleo (IPIECA, do inglês *International Petroleum Industry Environmental Conservation Association*) a utilização de dispersante químico é uma ferramenta importante de remediação em ambientes marinhos sob efeitos de derramamentos de óleo. Os dispersantes são agentes tensoativos que podem conter em sua formulação um ou mais surfactantes não-iônicos, surfactantes aniônicos ou solventes projetados para solubilizar a mancha de óleo, reduzindo a tensão interfacial do óleo, fazendo com que ela forme

gotículas com diâmetro de 0,05 a 0,1 mm (IPIECA, 2014) (Figura 14). Essas gotículas tendem a se movimentar na coluna d'água, acelerando o processo de dispersão, favorecendo a biodegradação do óleo no meio ambiente (VENOSA; HOLDER, 2007).

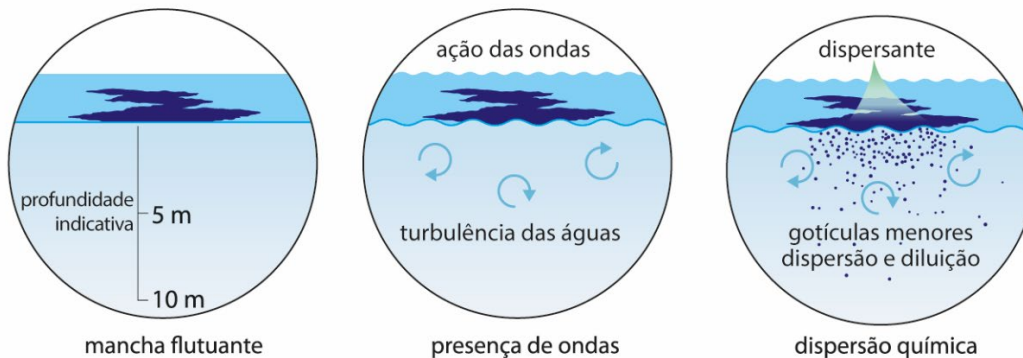


Figura 14: Esquemática da dispersão do óleo por dispersantes químicos (IPIECA, 2014).

O dispersante Corexit 9500c é mundialmente utilizado para remediação em vazamentos de petróleo, pois minimiza os danos a longo prazo causados pelo óleo, como a permanência de uma camada insolúvel de óleo na superfície, impedindo a irradiação solar na coluna d'água. Além disso, aumenta a biodisponibilidade das frações do óleo para que estes sejam degradados por micro-organismos, auxiliando na assimilação destes compostos no ambiente. Outro aspecto positivo dos dispersantes, é que impede que o óleo chegue às áreas costeiras e evite a geração de resíduos oriundos dos processos de retirada do óleo (IPIECA, 2014; LESSARD; DEMARCO, 2000). O Corexit 9500c, contudo, possui em sua composição diversos compostos nocivos ao meio ambiente como ácido sorbitano, butanoico, propilenoglicol, sulfonato orgânico, dioctilsulfosuccinato de sódio e destilados de petróleo, que podem bioacumular nos tecidos dos animais marinhos (<https://www.nalcoenvironmentalsolutionsllc.com/corexit/> acessado em 22 de março de 2019).

No Brasil a aplicabilidade de dispersantes é baseada na resolução 430 do CONAMA (2011) a qual recomenda-se que o dispersante seja aplicado em até 24 horas do derramamento de óleo para que os processos de intemperismo do óleo não interfiram na eficiência do produto.

O dispersante químico ao ser pulverizado nas manchas de óleo visa dispersar o óleo bruto da superfície, particularmente quando a remoção mecânica não é eficiente, minimizando os impactos causados pelo óleo flutuante, por exemplo, contaminação direta de aves ou zonas costeiras sensíveis. O uso da remediação com dispersantes em áreas próximas a recifes de corais pode causar impactos nesses ambientes, pois o uso destes compostos pode potencializar a ação dos contaminantes. Isso ocorre por meio do aumento da solubilidade de algumas frações do óleo, elevando a concentração de hidrocarbonetos na coluna d'água e ampliando a exposição dos corais ao contaminante (HAAPKYLÄ; RAMADE; SALVAT, 2007). A Resolução 472 do CONAMA (2015), regulamenta o uso de dispersantes químicos em caso de derramamento de óleo no mar, em virtude da grande exposição deste ambiente a acidentes. Apesar dos dados demonstrarem que o uso de dispersantes pode ser mais tóxico para os corais do que o óleo, os estudos realizados até o momento utilizaram sistemas fechados e pouco realistas, em um curto período (até 48 horas de exposição). Esses produtos ainda são utilizados em casos de desastres de derramamento de óleo próximos a recifes de corais. No derramamento de óleo da plataforma *Deep Horizon*, no Golfo do México a comunidade coralínea foi drasticamente afetada pelo dispersante COREXIT 9500C que foi utilizado na tentativa de remediar o local impactado (GOODBODY-GRINGLEY et al., 2013). Além disso, Deleo e colaboradores (2016) demonstraram os efeitos tóxicos do óleo e dispersante, uma estratégia de remediação química amplamente aplicada em derramamentos de óleo - em três espécies de coral de águas profundas; *Paramuricea tipo B3*, *Callogorgia delta* e *Leiopathes glaberrima*. Ruiz-Ramos e colaboradores (2017) também mostraram que a exposição do *Leiopathes glaberrima* ao óleo de coral negro, previamente disperso por remediação química, era prejudicial à saúde dos corais, como evidenciado pela expressão aumentada dos genes do microbioma de coral associados ao estresse.

No estudo de Reynier (2003), foram avaliados em mesocosmos os efeitos do petróleo e do tratamento utilizando dispersante químico (COREXIT 9500C) sobre a comunidade planctônica da região costeira de Angra dos Reis. Foi observada uma redução na densidade da comunidade fitoplânctonica causada não somente pelo óleo, mas também pelo dispersante químico. Outros grupos planctônicos também sofreram

queda em sua quantidade e diversidade com a exposição a esses compostos químicos. Esses dados demonstram a necessidade de alternativas sustentáveis para a remediação de ambientes contaminados com petróleo, considerando a toxicidade desses compostos podem atingir diversos níveis tróficos marinhos.

Para avaliação do efeito de derramamento de óleo e as estratégias de remediação no ambiente marinho, não se pode realizar experimentos em ambientes naturais pelos óbvios efeitos danosos ao meio ambiente. Em contrapartida, é difícil de reproduzir condições realistas em um ambiente de laboratório. Assim, para esses estudos pode-se utilizar sistemas de mesocosmos, os quais mimetizam de forma mais realista as condições naturais, e fornecem dados mais confiáveis sobre a dinâmica biológica envolvida no processo (DUARTE, et al, 2016).

1.5 Mesocosmo

Estudos de campo proporcionam a melhor oportunidade para simular dinâmicas complexas de contaminantes dentro de ambientes e para entender os efeitos de derramamentos de óleo sob condições realistas (CULP et al., 2017), bem como testar estratégias de mitigação. No entanto, o número de variáveis não controladas em estudos de campo pode dificultar o entendimento das consequências da poluição causada pelo derramamento de óleo (ADAMS, 2003). Além disso, experimentos de campo em que contaminantes tóxicos são liberados no meio ambiente devem ser evitados sempre que possível.

Para superar tais limitações, as condições de campo podem ser reproduzidas por micro e mesocosmos, que são estruturas de vários tamanhos (capacidade de 1 litro a > 10.000 litro).

Essas estruturas podem utilizar equipamentos especialmente projetados para controlar e manipular parâmetros físico-químicos, além de mimetizar as condições ambientais naturais (DUARTE et al., 2016; LUCKETT et al., 1996; ODUM, 1984). Para que um sistema de mesocosmo seja considerado aceitável, ele deve fornecer condições semelhantes ao ambiente natural, replicação verdadeira ao longo do tempo, condições

auto-sustentáveis e o estabelecimento de uma comunidade biológica representativa (BLASCO et al., 2016; RIEBESELL et al., 2010).

As vantagens de usar mesocosmos incluem: melhor reprodução das condições ambientais em comparação com bioensaios de laboratório e dados reprodutíveis de alta qualidade, que são mais fáceis de coletar e interpretar do que em estudos de campo convencionais (ODUM, 1984; LUCKETT et al., 1996). Além disso, os mesocosmos são muito versáteis e podem ser adaptados para trabalhar com uma variedade de fatores estressantes. No entanto, existem algumas limitações, tanto na estrutura do sistema, como o uso de bombas de água que podem falhar e gerar um custo oneroso para o estudo, como na capacidade de compreender a interação entre os nichos marinhos e mimetizar da forma mais realista. O estudo da interação dos corais com outros organismos pode ser especialmente crítico por causa de seus numerosos organismos competitivos e simbióticos, e pelo efeito do impacto ambiental sob essas interações. Compreender os efeitos individuais e interativos de diferentes estressores em corais é desejável para aumentar a saúde e a resiliência desses organismos a esses contaminantes (PETERSEN; CORNWELL; KEMP, 2007; PUTNAM et al., 2017; REILLY, 2007). Para isso, é importante o desenvolvimento de mesocosmos que possam simular de forma realista uma melhor reprodução das condições ambientais em comparação com bioensaios de laboratório e dados reprodutíveis de alta qualidade que são mais fáceis de coletar e interpretar do que em estudos de campo convencionais.

Por exemplo, Duarte e colaboradores (2016) projetaram um mesocosmo para estudar os impactos do estresse térmico e da acidificação nos corais. Os autores descobriram que o sistema de mesocosmos permitia a medição das respostas de estresse ecológico, biológico e fisiológico dos corais a uma variedade de parâmetros ambientais.

Esses estudos mostram que os mesocosmos podem ser estruturas versáteis e adaptáveis para trabalhar com uma variedade de fatores estressantes em diferentes modelos biológicos, simulando diferentes habitats, inclusive recifes de corais.

2. JUSTIFICATIVA

As atividades de extração de petróleo no Brasil vêm se intensificando ao longo do tempo. Segundo a Agência Nacional do Petróleo, Gás natural e Biocombustíveis (ANP) pelo quarto ano consecutivo a produção nacional de petróleo atingiu cerca de 2,6 milhões de barris/dia no ano de 2017. Isto representa um aumento de 4,2% em relação ao ano de 2016 (ANP, 2019) impulsionado principalmente pelo petróleo extraído do pré-sal. Esse segmento alcançou produção de 1,3 milhões de barris/dia contabilizando cerca de 50% da produção nacional.

No entanto, o aumento da atividade petrolífera em alto mar é um fator preocupante sob o ponto de vista ambiental, considerando que quanto maior a escala da atividade, maior é a chance de ocorrer acidentes. Como agravante, campos de exploração do pré-sal podem estar próximos a regiões de alta biodiversidade, como por exemplo, o campo de Frade, que fica em torno de 140 km da Armação dos Búzios (RJ), local onde há grandes colônias de corais, que albergam uma alta biodiversidade marinha.

Para preservar os recifes de corais, as companhias petrolíferas presentes em território brasileiro devem seguir as leis e resoluções impostas. Entretanto, mesmo tomando as medidas preventivas, derramamentos acidentais ocorrem, e, portanto, é imprescindível o desenvolvimento de estratégias para minimizar os danos e recuperar as áreas. Assim, torna-se imperativo o desenvolvimento de estudos para avaliar os impactos de um derramamento de óleo e a efetividade das estratégias de remediação química e biológica existentes.

O desenvolvimento desses estudos é um grande desafio, dada a complexidade ambiental natural do ambiente marinho. Portanto, a construção de estruturas experimentais que simulam condições reais, que apresentem reprodutibilidade experimental e levando em conta o baixo custo, são imprescindíveis para sua execução. Além disso, a avaliação dos impactos causados pelos dispersantes químicos, e o uso de métodos de base biotecnológica, como o consórcio degradador de petróleo, são de importância científica e tecnológica. O uso de biotecnologias na recuperação ambiental constitui uma forte tendência por representarem menor impacto frente aos métodos tradicionais, e em geral são baseadas na utilização de apenas um grupo de micro-

organismos, ao invés de composições mistas. Esta estratégia biotecnológica é inovadora e apresenta potenciais expressivos, que poderão mais bem explorados em cenários futuros, inclusive através da utilização de consórcios mistos. Nesse sentido, o presente trabalho se propõe a i.) desenvolver um sistema experimental de mesocosmo para simular derramamentos de petróleo e a aplicação de estratégias de remediação em ambiente marinho, e ii.) avaliar a resposta do hidrocoral *M. alcicornis* a contaminantes petrogênicos e as estratégias de remediação química (Corexit 9500cc) ou biológica utilizando um consórcio misto (bactérias, fungos e leveduras) degradadores de óleo.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi o desenvolvimento de um sistema de mesocosmo realista, capaz de maximizar a reprodução das condições naturais no momento de um derramamento de óleo e a avaliação do impacto causado pelo óleo e o uso de diferentes estratégias de remediação no hidrocoral *Millepora alcicornis* e seu bacterioma associado.

3.1 Objetivos específicos

Artigo 1

- Desenvolver um sistema de mesocosmo operando com (a) fluxo contínuo; (b) sistema aberto ou fechado; (c) fluxo por gravidade; (iv) seções de mesocosmos separadas que podem ser usadas para experimentos individuais e simultâneos.

- Validar o sistema em relação a eficiência do operacional e verificar se o próprio sistema afeta a comparação de tratamentos durante os experimentos, usando duas configurações diferentes:
 - (a) Concentração de 0,07% v/v de óleo, utilizando seção de estocagem de alto volume de água do mar (20.000 L) e etapa de diluição.

 - (b) Concentração de 1% v/v de óleo, sem utilização da seção de estocagem de alto volume de água do mar e sem etapa de diluição.

- Avaliar os parâmetros físico-químicos, concentração de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) e Hidrocarbonetos Totais do Petróleo (HTP) na fração dispersa do óleo em água no sistema de mesocosmo nas diferentes configurações do sistema avaliadas.

- Avaliar a resposta da fisiologia e a saúde do hidrocoral perante o contaminante óleo através do rendimento quântico máximo das microalgas simbióticas fotossintéticas presente no hidrocoral *M. Alaicornis* nas diferentes configurações do sistema avaliadas.

-

Artigo 2

- Selecionar e desenvolver um consórcio biorremediador misto, com potencial probiótico para corais (pBMC-BC, do inglês putative *Microorganisms to Corals – Biorremediator Consortium*), formado por micro-organismos isolados de água do mar e de corais (fungos, bactérias e levedura).
- Montar um experimento em mesocosmo para simular um derramamento de óleo e aplicar técnicas isoladas e combinadas de remediação química e biológica, avaliando a dinâmica dos fatores i. óleo, ii. dispersante (Corexit 9500cc), iii. pBMCBC ao longo do tempo.
- Avaliar a concentração de Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos (HAP) na fração dispersa do óleo em água no sistema de mesocosmo.
- Avaliar a resposta da fisiologia e a saúde do coral do hidrocoral frente aos impactos dos fatores supracitados, através da análise dos aspectos morfológicos e do rendimento quântico máximo das microalgas simbióticas fotossintéticas.
- Avaliar a resposta do bacterioma associado ao hidrocoral frente aos impactos dos fatores supracitados através do sequenciamento em larga escala (Illumina Miseq).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Construção do Mesocosmo PROCORAIS no Centro de Estudos de Biorremediação de Óleo em Ambientes Marinhos (artigo 1)

A estrutura do mesocosmo foi construída no Centro de Estudos de Biorremediação de Óleos em Ambientes Marinhos, em uma iniciativa conjunta da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) e do Centro de Pesquisa e Desenvolvimento da Petrobras (CENPES), na cidade de Armação dos Búzios no Estado do Rio de Janeiro, Brasil.

A localização do mesocosmo e a melhor posição em relação a luz solar e ao direcionamento do vento foram selecionadas para reproduzir as condições naturais de iluminação, usando o software SketchUp Pro (Trimble Navigation Limited, 2015) (Figura 15).

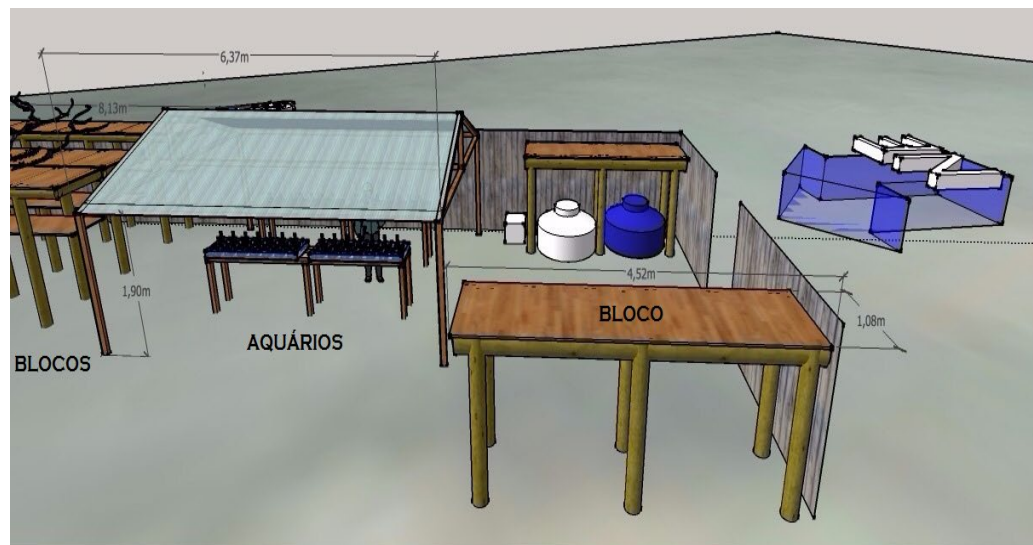


Figura 15: Esquema em 3D dos blocos que acomodarão os tratamentos químicos e biológico realizado pelo software SketchUp Pro.

O Mesocosmo foi projetado para ser um sistema adaptável à diversas configurações dependendo dos requisitos do experimento. Especificamente para este experimento, foi configurado para: a) ter fluxo contínuo, b) operar como um sistema

aberto ou fechado; c) ser alimentado por gravidade, evitando o uso de bombas e possíveis entupimentos devido ao uso de óleo no sistema d) ter as seções de mesocosmo independentes, que podem ser utilizadas separadamente em experimentos simultâneos; e) simular a migração de óleo do local de um derramamento até a chegada em recifes próximos. Além disso, foi projetado para que diferentes organismos marinhos sejam utilizados nos aquários experimentais (Silva, et al, 2019).

O mesocosmo pode conter até 13 tratamentos (52 tanques de estoque independentes e 52 tanques de diluição independentes no total) com 4 repetições cada, com a opção de reconfigurar o sistema para menos tratamentos com maior replicação.

Este sistema de mesocosmo foi dividido em três seções:

- a) seção de armazenamento de água do mar (estruturas 1, 2 e 3 da figura 12);
- b) seção de estoque de contaminantes (representando o oceano aberto onde o derramamento ocorreria) (estruturas 4, 5 e 6 da figura 12);
- c) Seção experimental de aquários (representando os “recifes”). O caminho dos tanques para os aquários representou o caminho da água contaminada da área de derramamento até o recife de coral (Estruturas 7,8,9 e 10 da Figura 12).

- a) Seção de armazenamento de água do mar

Esta seção foi elaborada para que a água do mar utilizada em todo o experimento circulasse continuamente entre dois tanques de armazenamento de polietileno de 20.000 L (Fortelev®, Camaçari, Bahia, Brasil) ao nível do solo e um tanque suspenso de polipropileno de 300 L (Moar Plasticos®, São Paulo, Brasil) 6 metros acima do solo. Do primeiro tanque de armazenamento, a água do mar era transferida para o segundo tanque de armazenamento de polietileno de 20.000 L através de um tubo de 60 mm de diâmetro (Tigre®, Joinville, Santa Catarina, Brasil) que transportava água do mar para os tanques de estoque através de 4 tubos de PVC (policloreto de polivinila, Figura 16). O excesso de água do mar do tanque de distribuição era recirculado para os dois tanques

de 20.000 L para garantir a oxigenação e condições homogêneas em todo o sistema de armazenamento e distribuição. O sistema utiliza uma única bomba elevatória de água de 20.000 L.h⁻¹ (JEBO Lifetech Sp620, Monterey Park, Califórnia, EUA) na seção de armazenamento de água do mar. Ao distribuir o fluxo de água por gravidade, o sistema otimiza o uso energético, dispensando a utilização de muitas bombas de água, evitando problemas inerentes a falhas mecânicas. Além disso, o uso de uma única bomba reduz os custos de implementação e manutenção, fatores que podem restringir os sistemas de mesocosmo.

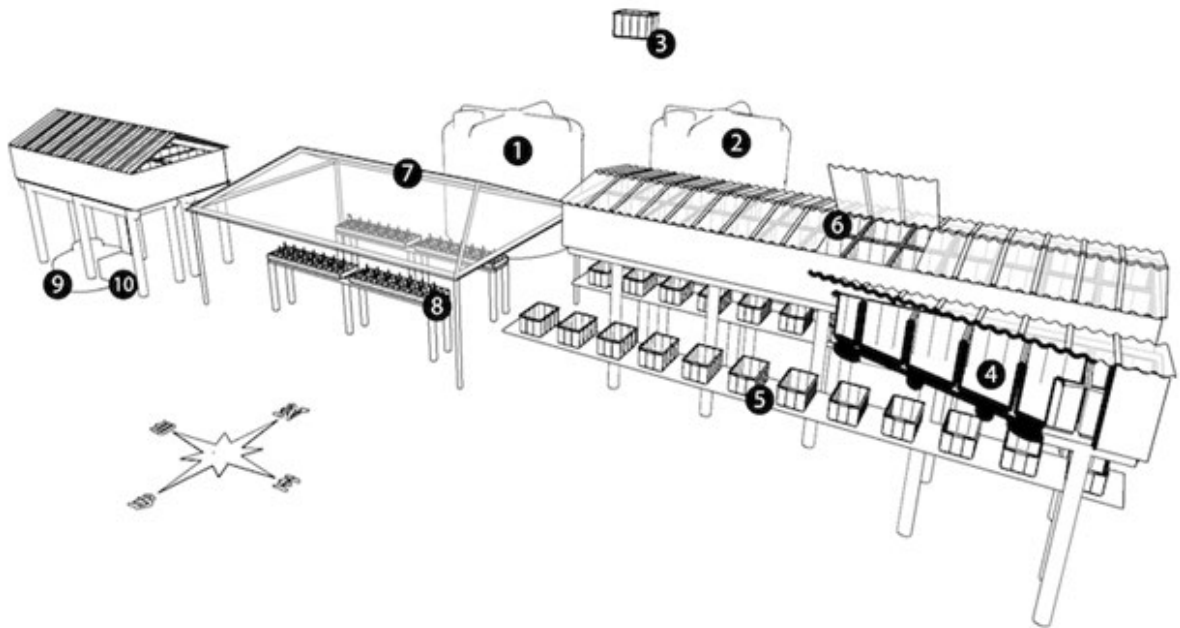


Figura 16: Plano do sistema de mesocosmo: seção de armazenamento de água do mar: tanque primário de armazenamento de água do mar (1), tanques secundários de armazenamento de água do mar (2); tanque suspenso (3); Seção de estoque de contaminantes: tratamentos de remediação química e biológica (4) e (6) e tanques de diluição (5); Seção de aquários experimentais: telhado de policarbonato (7); aquários e banhos de água (8); reservatório de água fria (9) e unidade de resfriamento (10).

b) *Estoque de contaminantes*

Esta sessão foi constituída por tanques de estoque (óleo, dispersante e biorremediação) de polipropileno de 300 L (Moar Plásticos®, Campinas, São Paulo). Estes tanques foram alojados em 3 plataformas de 3 metros acima do solo (Figura 17 e

18). Cada tanque de estoque foi emparelhado com um tanque de diluição de polipropileno de 26 L (Moar Plásticos) que também era alimentado por gravidade e tinha um borbulhador de ar para melhor homogeneizar os tratamentos. Os tanques de diluição de 26 L também estavam conectados diretamente ao tanque de distribuição de 300 L contendo água do mar. Assim, a concentração de contaminantes pôde ser ajustada precisamente controlando-se o fluxo dos tanques de distribuição e estoque para os tanques de diluição. Todos os tanques foram mantidos à temperatura ambiente, e os níveis de água em todos os tanques de estoque e diluição foram mantidos estáveis com um interruptor de flutuação para que a fração solúvel do óleo fosse liberada para a coluna de água gradativamente. Em cima de cada uma das plataformas foi construído um telhado retrátil de polipropileno para evitar contaminação dos tratamentos por chuva, folhas ou outros agentes indesejados. No entanto, a cobertura só era acionada na ocorrência de fatores climáticos indesejados, ficando aberta nas demais condições para que a luminosidade, vento e temperatura se mantivessem nas condições que no ambiente marinho.

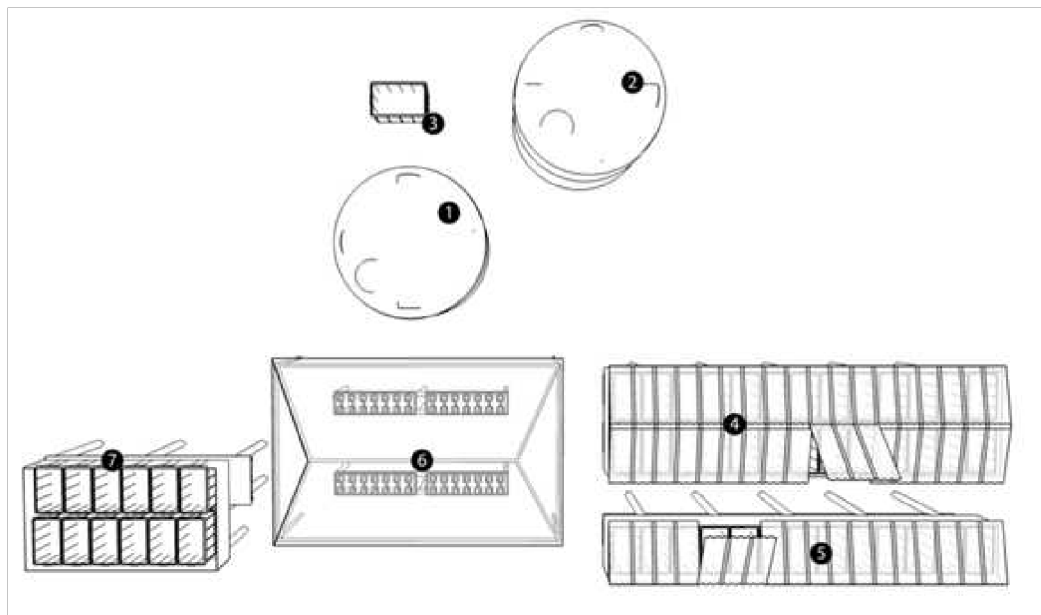


Figura 17: Esquema do sistema de mesocosmo: seção de armazenamento de água do mar: tanque primário de armazenamento de água do mar (1), tanque secundário de armazenamento de água do mar (2), tanque suspenso (3); Seção de estoque de contaminantes: tratamentos de remediação química e tanques de diluição (4), (5) e (7); e seção de aquários experimentais: aquários e banhos de água (6).



Figura 18: Seção de estoque de contaminantes: Armazenamento das caixas de estoque na parte superior abaixo do telhado de polipropileno e as caixas de diluição armazenadas na parte intermediária da estrutura.

Os tanques de diluição foram conectados a uma mangueira de polietileno de 6,35 mm (diâmetro externo; Rubberplastic, Cajamar, São Paulo) que por sua vez estava conectada a uma mangueira de polietileno de 4,35 mm (diâmetro interno; Rubberplastic). Esta mangueira fornecia água do mar contaminada para o aquário experimental e era conectada a uma última mangueira de silicone (1,02 interno e 2,16 de diâmetro externo; Plasmundi, Casa Verde, São Paulo) que alimentava os aquários e responsável por controlar todo o fluxo do sistema. O sistema de captação de água do mar tinha uma válvula de vazão (3 × 3 × 3,5 cm; Sr. PET, Ipiranga, São Paulo) para permitir que a diluição fosse ajustada, fixando a concentração do composto nos tanques contaminantes, bem como o fluxo de entrada de água nos tanques de diluição.

C) Seção De Aquários Experimentais

A seção de aquários experimentais (Figura 19 e 20) do mesocosmo recebia os tratamentos experimentais dos tanques de diluição. Esta seção foi composta por 4 banhos-maria, cada um com um controle de temperatura independente. Cada banho-maria podia comportar até 14 aquários. Cada aquário uma pequena plataforma para facilitar a coleta de amostras. Cada aquário possuía um sistema de injeção de ar para misturar a água e remover o excesso de muco coral, reduzindo o efeito da camada limite. A estrutura do mesocosmo foi coberta com um teto de policarbonato e a luminosidade foi regulada com um sombrite de 70% (30% de luz transmitida; Equipesca, Campinas, São Paulo). A intensidade de luz que os aquários receberam foi de $106,45 \pm 1,95 \mu\text{mol}$ de fótons $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e foi medida com um medidor de luz LI-250 com um sensor LI-190SA (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, EUA).

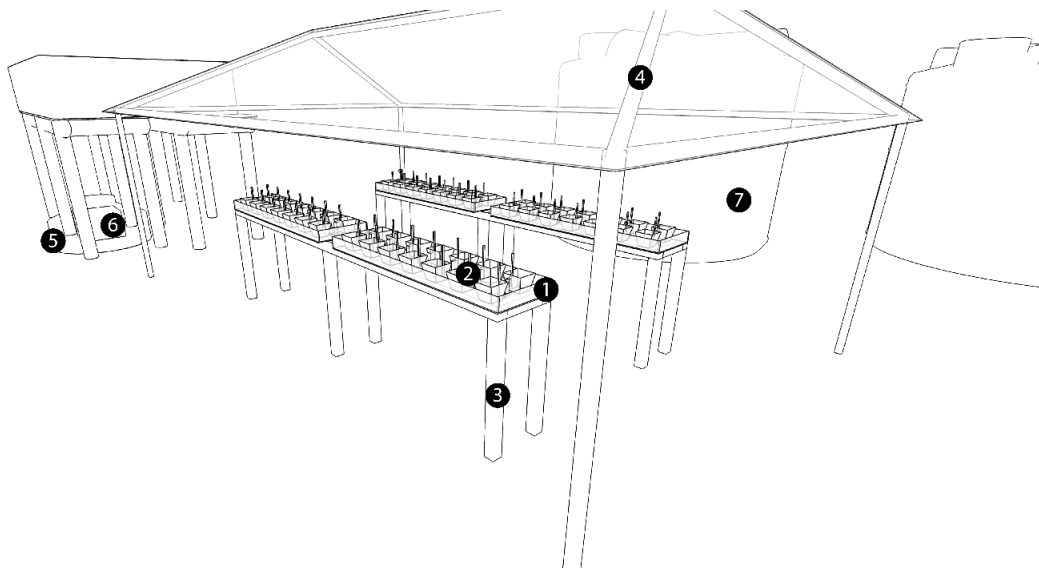


Figura 19: Vista esquemática da seção experimental dos aquários (1), aquários experimentais (2); suportes para banho-maria (3); teto de policarbonato (4); reservatório de água fria (5); unidade de refrigerador (6); 2 reservatórios de 20 mil L de água (7).



Figura 20: Esquema em 3D da seção de aquários experimentais realizado pelo programa SketchUp Pro.

Cada aquário tinha um sistema de transbordamento através de uma abertura no vidro que permitia que a água recebida do tanque de diluição fluísse para um único sistema de tratamento de águas residuais. Este sistema de tratamento de efluentes foi composto por um separador de óleo e água (ZP5000, Zeppini, São Bernardo do Campo, São Paulo) conectado a um filtro de carvão ativado (BOYU, Guangdong, China) para retenção de hidrocarbonetos dissolvidos (Figura 21). Toda a água do sistema (incluindo controles) foi recuperada, tratada e disposta no sistema de esgoto convencional, e os resíduos de óleo foram armazenados e enviados para o ponto mais próximo de coleta e tratamento (posto de gasolina). O sistema de tratamento de efluentes tinha capacidade para receber 800 L h^{-1} de água e 5 L h^{-1} de óleo e atende aos requisitos das normas da Associação brasileira de normas técnicas - ABNT 14605-2 NBR (ABNT, 2010) e do Regulamento Federativo Brasileiro - CONAMA 430 (CONAMA, 2011).



Figura 21: Módulo separador de água e óleo, B) módulo aplicado no sistema de mesocosmo.

Os aquários ficavam imersos em banho-maria e utilizavam um sistema de duas partes para controlar e manter as temperaturas (MT - 518Ri; Full Gauge Controls, Canoas, RS), com uma parte de água aquecida e outra com água resfriada. O sensor de controle de temperatura foi colocado em um aquário experimental aleatoriamente selecionado em cada um dos 4 banhos-maria. Para o resfriamento da água, o mesocosmo foi conectado a um tanque de 1000 L que foi parcialmente enterrado para aproveitar a capacidade do solo de manter a temperatura da água. Este tanque de estoque era abastecido com 800 L de água doce e conectado a um resfriador de água com tubo de serpentina de titânio (Chiller 1/4 HP; Gelaqua, Santos, São Paulo) para manter a água fresca a 18 °C. Este tanque de estoque foi conectado a uma bomba de 2000 L.h⁻¹ (SB-2000; Sarlo Better, São Paulo, São Paulo) que enviava água fria para os banhos-maria quando o controlador de temperatura era acionado. Um fluxograma esquemático do sistema de mesocosmos pode ser visto na Figura 22.

A estrutura da seção dos aquários experimentais foi planejada de maneira que esta não interferisse nos experimentos realizados. Devido a este fato a telha de policarbonato alveolar foi escolhida para que não houvesse interferência na passagem de luz solar para os aquários, que, além de bloquear a intensidade luminosa, é um material de baixo-custo.

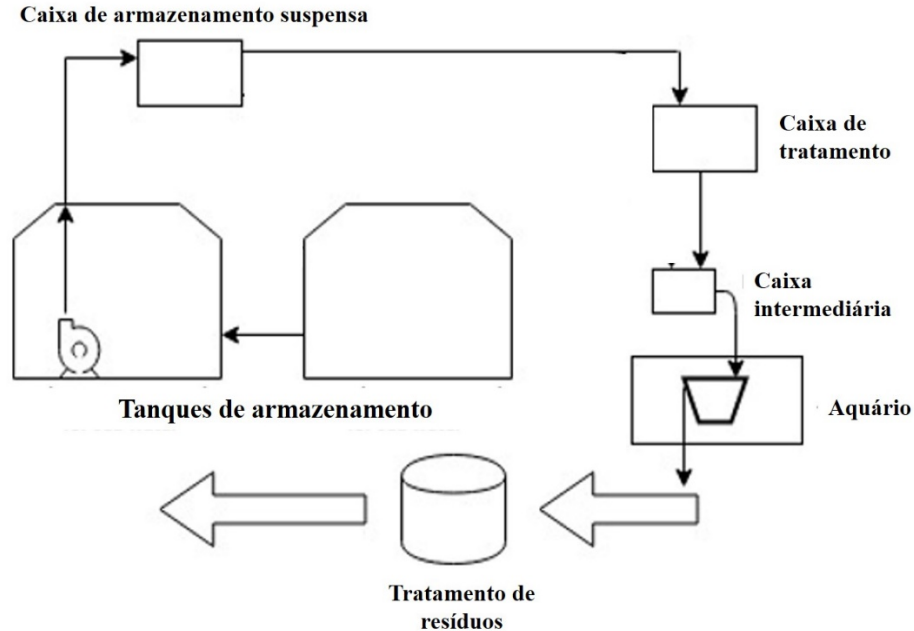


Figura 22. Fluxograma esquemático do fluxo da água do experimento no sistema mesocosmo.

4.1. Validação do mesocosmo PROCORAIS

Dois ensaios foram realizados para a validação do mesocosmo, com diferentes configurações do sistema. Em ambos os ensaios foi observada a capacidade do sistema de mimetizar as condições ambientais realistas, mantendo controle sobre fatores abióticos dentro de replicações de diferentes tratamentos. Os ensaios foram conduzidos em abril de 2016 e abril de 2017 e ambos foram executados como sistemas de fluxo contínuo. Durante o intervalo entre os experimentos, todos os tanques e aquários foram limpos e todas as mangueiras de 4,35 mm e 6,5 mm de diâmetro foram substituídas. Ambos os experimentos usaram petróleo cru da plataforma de Marlim, P-47 da Bacia de Campos (Rio de Janeiro, Brasil). Para a validação, foram avaliados os tratamentos com água do mar (CTRL) e óleo cru (O) foram aplicados nas duas configurações (1 e 2), em quadruplicata.

4.1.1. Ensaio de validação 1

No ensaio 1 que ocorreu em abril de 2016, foi testada a capacidade do mesocosmo de detectar impactos do WSF do óleo no hidrocoral *Millepora alcicornis* sob condições que mimetizam um derramamento de óleo sendo naturalmente diluído pelas correntes de água. Este ensaio foi projetado para simular a liberação gradual de óleo para a coluna de água em uma diluição observada em sistemas naturais (água do oceano) reproduzindo um pulso de água contaminada para o recife que lentamente se tornaria menos contaminado depois de algum tempo. Para atingir essas condições, o mesocosmo foi configurado como um experimento de sistema aberto alimentado pela gravidade em todo o sistema. O fluxo de água alimentado por gravidade era controlado pelos tanques de diluição. Estes tanques tinham um nível de água controlado que permitia que o peso da coluna de água fosse constante. A água do mar foi armazenada nos tanques de 20.000 L (seção de armazenamento de água do mar) e os tanques de 300 L foram reabastecidos constantemente nos controles e tratamentos. O óleo cru foi adicionado aos tanques de tratamento de óleo, que foram diluídos 10 vezes nos tanques de diluição para atingir uma concentração final de 0,07% (v/v). O experimento foi conduzido por 30 dias, com 9 dias para aclimatar os corais no mesocosmo e 21 dias para o experimento. Os parâmetros físicos, químicos e biológicos foram medidos a cada 2 dias no início e a cada 3 dias após o 12º dia de experimento.

4.1.2. Ensaio de validação 2

No segundo ensaio que ocorreu em abril de 2017, nosso objetivo foi testar a capacidade do sistema de fornecer uma concentração constante de poluentes aos aquários durante o experimento para testar os efeitos da contaminação aguda e constante de óleo sobre os corais. Nesta configuração, os seguintes ajustes foram realizados em relação ao ensaio 1. Primeiro, uma maior concentração de óleo cru (1%) (v/v) foi adicionada a um volume final de 250 L de água do mar nos tanques contaminantes. Em segundo lugar, os tratamentos não foram diluídos neste ensaio, a fim de simular um derrame de alta magnitude e aumentar a concentração de hidrocarbonetos solúveis na água. Em vez disso, tanques de diluição foram usados apenas para manter

o volume de água e permitir que o fluxo, por gravidade, fosse constante, mesmo com o volume dos tanques de contaminantes diminuindo com o tempo. Além disso, os tratamentos foram circulados nos aquários com um fluxo reduzido através dos tanques de 26 L, o que permitiu uma vazão de $0,72 \text{ L.h}^{-1}$, para aumentar a exposição dos organismos à WSF do óleo. Neste ensaio, o setor de armazenamento de água do mar não foi utilizado, uma vez que a diluição não foi aplicada e a água do mar dos tanques de tratamento foi suficiente para realizar todo o ensaio. Este segundo experimento foi realizado durante 23 dias (sem contar com o período de recuperação dos fragmentos após a coleta em campo que foi de 5 dias), com 10 dias para aclimatar os corais no mesocosmo e 13 dias de exposição dos fragmentos de corais às condições de contaminantes e remediadores químico e biológico. Os parâmetros foram medidos 4 vezes durante o experimento, incluindo o período de aclimação.

4.1.3. Coleta do hidrocoral *M. alcicornis* em campo

As colônias do hidrocoral *Millepora alcicornis* foram coletadas na Praia de João Fernandes, Armação dos Búzios ($22^{\circ} 44'29.95''\text{S}$; $41^{\circ} 52'35.62''\text{O}$)(Figura 23), durante o transporte e até o momento da fragmentação das colônias, os hidrocorais foram mantidos em caixas de 250 L e submersos em água do mar continuamente renovada, a qual as caixas foram cobertas com sombrites com capacidade para bloquear 70% da incidência solar e à mesma temperatura da água que o local de coleta. Este hidrocoral foi escolhido para realizar este estudo porque é uma das espécies de coral mais abundantes em Armação dos Búzios, principalmente na Praia de João Fernandes.

No mesocosmo, as colônias de *M. alcicornis* foram fragmentadas em pedaços de aproximadamente 5 cm de comprimento e 6 g de massa foram colados em suportes feito de azulejos, previamente limpos e marinados por 48 h. O coral foi manipulado apenas pelas pontas para evitar a obstrução e possivelmente danificar os pólipos. Os fragmentos foram colocados em todos os aquários experimentais.



Figura 23: Mapa da localização da Praia de João Fernandes (22°44'29.95"S; 41°52'35.62"O) e do Mesocosmo PROCORAIS (22°45'44.22"S; 41°53'3.97"O) em Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil.

4.1.4. Validação físico-química

4.1.4.1. Validação de temperatura, salinidade e pH

Os parâmetros Temperatura, salinidade e pH foram medidos durante os dois ensaios do Mesocosmo PROCORAIS com sonda multiparamétrica (modelo HI 9828; Hanna® Instruments, Tamboré, Barueri, São Paulo). Esses parâmetros eram registrados a cada 2 dias no início do experimento e a cada 3 dias no ensaio 1 (8 medidas no total). No ensaio 2, registramos esses parâmetros 4 vezes (dias 0, 1, 4 e 13). Em ambos os experimentos, incluímos o período de aclimação (ou seja, dia 0). A temperatura era controlada por banho maria ligado a termostato da marca Full Gauge®, e permaneceu durante todo o tempo de experimento a 24 °C.

4.1.4.2. Análise de Compostos Nitrogenados

Amostras de água do mar foram coletadas dos aquários e filtradas em membranas de celulose (tamanho de poro de 0,45 µm e diâmetro de 47 mm) para análises de compostos nitrogenados (nitrito, nitrato e amônio) em ambos os ensaios. Estas amostras

foram armazenadas em frascos âmbar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Ambientais do Instituto de Biologia da UFRJ, através do FIAstar® 5000 (Foss Analytical, Höganäs, Suécia) por processo de injeção de fluxo. Todas as análises foram realizadas segundo as especificações recomendadas pela FOSS conforme tabela 1.

Tabela 1 Metodologias certificadas pela empresa FOSS.

Nutriente	ISO	Nota de aplicação (<i>application note</i>)
Nitrito	23395-2996	5200
Nitrato	23395-2996	5202
N Amoniacal	22732:2005	5220

4.1.4.3. Análise de Carbono Orgânico Dissolvido

Carbono orgânico dissolvido (COD) foi avaliado em ambos os ensaios. Amostras de água do mar do aquário foram coletadas (60 mL) e filtradas em membranas de celulose de tamanho de poro de $0,45\text{ }\mu\text{m}$. A água do mar filtrada foi armazenada em frascos de vidro com tampas de Teflon com $50\text{ }\mu\text{L}$ de ácido fosfórico à temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$.

As amostras foram analisadas pela Unidade Multiusuário de Análises Ambientais, Instituto de Biologia da UFRJ, através do processo de oxidação com persulfato de sódio em forno de titânio sob alta temperatura e pressão. Um Analisador de Carbono Orgânico Total (COT- L) Sievers InnovOx (Shimadzu) foi utilizado para realizar as análises.

4.1.4.4. Quantificação de hidrocarbonetos de petróleo

Para analisar hidrocarbonetos totais de petróleo (TPH, do inglês *Total Polycyclic hydrocarbon*) hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAH, do inglês *Polycyclic aromatic hydrocarbon*) em ambos os experimentos, coletamos 1 litro de água do mar de cada aquário de tratamento replicado (óleo e controle, 4 repetições cada) em frascos de vidro

âmbar com tampas de Teflon. No ensaio 1, foram recolhidas amostras no dia 2 da experiência (36 h após o óleo ter sido adicionado nos tanques de contaminantes) e no 21º dia de experimento. No ensaio 2, as amostras foram colhidas no dia 2 de experimento (36 h após a adição do óleo no sistema de mesocosmo), bem como no 4º e 13º dia de experimento. Todas as amostras foram armazenadas a 4 °C até a análise, cerca de 24 h após a coleta, realizada pela empresa Eurofins- INNOLAB.

A empresa conduziu a extração dos hidrocarbonetos de acordo com o método 3510C (US EPA, 1996a). As análises de TPH foram realizadas utilizando a técnica de cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC / FID) de acordo com o método 8015B (US EPA, 1996b). Os 37 PAH foram detectados por cromatografia gasosa / espectrometria de massa (GC / MS) utilizando o método 8270D (US EPA, 2007).

4.1.4.5. Validação biológica - Capacidade fotossintética máxima do fotossistema II (F_v / F_m)

A eficácia do mesocosmo para detectar os efeitos biológicos dos derrames de óleo nos corais foi avaliada também comparando os valores de rendimento quântico máximo fotossintético (F_v / F_m) entre tratamentos e controles. A análise de F_v / F_m serve como uma estimativa da saúde das algas simbióticas fotossintéticas associadas ao hidrocoral *M. albicornis* e pode inferir diretamente no estado fisiológico dos hidrocorais nos tratamentos. O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado a partir dos valores de fluorescência, denominados F_o e F_m . 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 pela exposição a um pulso de luz saturante ($6.000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$) na presença de luz modulada. A diferença entre estes valores extremos corresponde ao valor de fluorescência vari\u00e1vel (F_v) e a rela\u00e7\u00e3o F_v / F_m representa a efici\u00eancia qu\u00e2ntica m\u00e1xima do fotossistema II. Medidas de F_v / F_m foram tomadas ao mesmo tempo e frequ\u00eancia dos par\u00e2metros f\u00edsicos e qu\u00edmicos com um pulso sub-aqu\u00e1tico e fluor\u00f4metro de amplitude modulada (DivingPAM; Heinz Walz, Effeltrich, Alemanha) com a seguinte configura\u00e7\u00e3o: Medindo a Intensidade da Luz (MI) = 6; Intensidade de pulso de satura\u00e7\u00e3o (SI) = 8; Largura de pulso

de saturação (SW) = 0,8; Ganho (G) = 1; Amortecimento (D) = 1. Para evitar interferência de artefatos diurnos de fotoinibição, as medidas foram tomadas 1 hora após o pôr do sol para garantir a recuperação completa dos centros de reação. A intensidade da radiação fotossinteticamente ativa em cada aquário foi medida usando um sensor de fibra quântica (1 mm de diâmetro) conectado ao Diving-PAM. Para a análise, a sonda era posicionada no tecido de pólipos de coral, usando um pólipo aleatoriamente selecionado por aquário, e o mesmo fragmento de coral (de cada réplica, $n = 4$) foi usado para medir a fluorescência da clorofila em diferentes épocas de amostragem. Os hidrocorais foram aclimatados no escuro por 20 min, pois esse período escuro resulta no desaparecimento dos processos não fotoquímicos a partir da dissipação da energia de excitação do fotossistema II.

4.2. Análise Estatística da validação do mesocosmo

As comparações estatísticas das medidas repetidas foram realizadas com o pacote nlme (PINHEIRO et al., 2017) no software estatístico R (R Core Team 2017). Para esta análise, utilizamos a função de lme (PINHEIRO et al., 2017) para criar um modelo de efeitos mistos com “Dias” e “Tratamento” (controle ou óleo) como efeitos fixos interativos e a identidade do aquário como um efeito aleatório. Em seguida, realizamos uma análise post-hoc para estimar as médias dos mínimos quadrados e identificar as interações pareadas estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre “Dia” e “Tratamento” (pacote lsmeans) (LENTH, R.; LENTH. M, 2018) através do teste de Tukey. As medições fisiológicas foram transformadas em log conforme necessário para atender aos pressupostos de normalidade e homocedasticidade dos resíduos do modelo.

Avaliação do bacterioma da *M. alcicornis* frente a contaminação de óleo com a utilização de dispersante e consórcio de multi-domínio probiótico remediador (artigo 2)

As licenças ambientais para as coletas de água de coral foram aprovadas junto à Secretaria Municipal de Meio Ambiente e Pesca da cidade de Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brasil (números 021/2016 e 014/2016, respectivamente).

4.3 Isolamento do Consórcio microbiano degradador de óleo

4.3.1 Preparação de meios de cultura e soluções

Solução Salina de NaCl a 0,85% (m/v)

A solução de Cloreto de Sódio (NaCl) a 0,85 % (m/v) foi preparada dissolvendo-se 0,85g de NaCl em 100 mL de água ultrapura e autoclavada a 121°C e pressão 1,1 atm durante 15 minutos.

Meio de cultura com a Fração solúvel do óleo (oWSF) e a Fração insolúvel do óleo (oWIF)

Para a preparação dos meios bacterianos, foram obtidas as frações solúveis do óleo (oWSF, do inglês *oil water-soluble fraction*) e a insolúveis do óleo (oWIF, do inglês *oil water-insoluble fraction*), que foram adicionadas ao meio como fonte única de carbono. Para isso, foram adicionados 50 mL de óleo cru (óleo de Marlim P-47 cedida pela PETROBRAS) em 5 L de água do mar estéril em frasco Erlenmeyer a uma concentração final de 1% e manteve-se sob agitação constante (150 x g) durante 48 horas. As frações oWSF e oWIF foram separadas com o auxílio de uma bomba e uma pipeta de vidro estéril de 25 mL. Essas frações foram suplementadas ao meio BH (Bushnell-Haas Sigma, USA)

ágar (Figura 24). Duas diferentes concentrações de salinidade foram utilizadas nestes meios: 2,5% e 8%. Com isso, obtivemos quatro tipos de meio de cultura como o - BH-oWSF com 2,5% de NaCl, BH-oWSF com 8% de NaCl, BH-oWIF com 2,5% de NaCl e BH-oWIF com 8% de NaCl.



Figura 24: Distribuição dos meios de cultivo com FIA nas placas de petri.

Meio de cultura para o isolamento de fungos

Para o isolamento dos fungos, foram utilizados meio BH suplementado com 0,1% de glicose e 0,05% de extrato de levedura (BH-G), com a adição de 10% de oWSF e oWIF em placas separadas. Além disso, também foram utilizadas as salinidades de 2,5% e 8% resultando em quatro tipos de meio como BH-G-oWSF com 2,5% de NaCl, BH-G-oWSF com 8% de NaCl, BH-G-oWIF com 2,5% de NaCl e BH-G-oWIF com 8% de NaCl. Além destes meios citados anteriormente, foi preparado um meio de cultivo BH suplementado com 2% extrato de malte, 0,05% de extrato de levedura, no entanto, sem a presença do óleo (BH-M com 2,5% de NaCl). Todos os meios continham 0,05% de amoxicilina, 0,04% de cloranfenicol e 0,1% de ciclohexamida, para a inibição de crescimento de populações prevalentes de fungos.

4.3.2. Coleta dos corais e da água circundante

Para a realização do isolamento de micro-organismos degradados de óleo, fragmentos dos corais das espécies *Millepora alcicornis* e *Siderastrea stellata* e a água do mar circundante foram coletadas na praia dos Ossos, na região de Armação de Búzios, Rio de Janeiro (22°44'45"S, 41°52'54"O) em setembro de 2014 e janeiro de 2015. A Praia dos Ossos foi selecionada por ter sido submetida a diversas atividades antrópicas que poluem a área com hidrocarbonetos de petróleo, como pequenos vazamentos de combustíveis das embarcações.

Os fragmentos de coral foram colocados em recipientes estéril contendo água do mar e mantidos a 4°C por 4 horas até serem processados no laboratório.

4.3.3. Isolamento dos potenciais micro-organismos degradadores de óleo

Para realização do isolamento microbiano a partir das amostras de corais foram macerados 5g de cada espécie e ressuspensos em 45 ml de solução salina 0,85%. O macerado foi colocado em um frasco de cultivo de 125 mL contendo aproximadamente 15 unidades de esferas de vidro de 4,5 mm estéreis. Em seguida, estes foram colocados sob agitação constante de 150 x g, na temperatura de 26°C pelo período de 16 horas ou *overnight*.

As amostras de água foram filtradas em triplicata (alíquotas de 500ml, 200ml e 100ml). Os filtros foram ressuspensos em 10 ml de solução salina 0,85% e agitados continuamente por 16 horas a 26°C. Após este procedimento 100 µl desta solução dos filtros foram plaqueados nos meios de cultura (FSA e FSI). Todos os procedimentos foram realizados em triplicatas.

O isolamento bacteriano foi realizado com o plaqueamento de 100 µL das diluições seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁶, para garantir o isolamento de colônias individualizadas. As amostras da água do mar foram realizadas diluições seriadas de 10⁻¹ até 10⁻⁹ com solução salina de NaCl a 0,85% (m/v) e plaqueadas sem a necessidade de obter um preparo prévio. As placas foram mantidas 26 °C por 1 a 3 dias para que houvesse o crescimento de colônias. Para garantir a pureza dos isolados, colônias foram repassadas para novas placas individuais de crescimento através da técnica do esgotamento. O meio

utilizado para a passagem das colônias foi ágar marinho (MA, do inglês *marine agar*) (HiMedia). Para o estoque, colônias individuais foram crescidas em meio caldo marinho (MB, do inglês *marine broth*) (HiMedia) sob agitação constante de 150 x g, a uma temperatura de 26 °C. Após 16 h de crescimento ou *overnight*, as culturas foram armazenadas no freezer -80 °C em criotubos com glicerol à 20% (v/v) até serem utilizadas novamente.

Para o isolamento dos fungos, foram realizados métodos de plaqueamento para as amostras de água do mar e para o macerado de coral. Para a água do mar, 400 mL da mesma foram filtrados em membranas 0,22 µm. Os filtros foram ressuspensos em 10 mL de solução salina de NaCl a 0,85% (m/v) e colocados sob agitação constante a 26°C durante 16 horas. Após esta etapa, 100 µL da solução dos filtros foram plaqueadas nos meios de cultura. Para o macerado de coral, 200 µL do mesmo foram plaqueados. Os meios de cultura foram descritos na seção 4.3.1. As placas foram incubadas a 26 °C e o crescimento de novas colônias foram acompanhados durante 3°, 5°, 7, 14, 21 e 28 dias de isolamento. Cada colônia (fungo filamentoso ou levedura) que apresentou morfotipo distinto, foi repassado para nova placa quantas vezes necessário até que estivessem puros. Em uma primeira etapa de seleção para verificação da capacidade de degradação, os fungos e leveduras isolados foram plaqueados novamente em BH-G-WFI e BH-G-WFS contendo 2,5% de NaCl, e apenas os que foram capazes de crescer em menos de 5 dias, foram selecionados para as etapas seguintes de seleção. Os potenciais degradadores foram agrupados de acordo com sua morfologia. Um representante de cada morfotipo foi selecionado para que as próximas etapas de seleção.

4.3.4. Identificação dos potenciais biodegradadores de óleo

4.3.4.1. Extração de DNA dos micro-organismos potenciais degradadores

A extração de DNA genômico dos isolados pertencentes ao consórcio microbiano degradador de óleo (pBMC-BC) foi realizada seguida de amplificação feita por PCR (Reação em cadeia da polimerase, do inglês *Polymerase chain reaction*) das suas respectivas regiões-alvo (gene codificante do RNAr 16S para bactérias e região ITS para leveduras e fungos). Para as bactérias, os estoques armazenados em glicerol, foram reativados em 2 mL de meio MB e crescidos à 26 °C sob constante agitação. Após o

crescimento, os isolados foram submetidos a extração de DNA com a utilização do kit Wizard Genomic DNA Purification (Promega, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a extração de DNA de fungos e leveduras, as linhagens foram crescidas em meio MS a 25° C por 3 a 4 dias. Uma fração da biomassa celular foi recuperada da placa e ressuspensa em 2 mL de água de ultrapura. A partir de então, o mesmo kit utilizado para bactéria com as mesmas recomendações do fabricante foram seguidas.

4.3.4.2. Sequenciamento dos isolados do consórcio microbiano

O sequenciamento das estirpes de bactérias foi realizado da amplificação dos genes do RNAr 16S 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'). A reação de PCR foi realizada em volume final de 50 µL, contendo 5 µL de tampão 10X, 2 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 5 mM de cada iniciador, 10 ng de DNA genômico e 2.5 U da enzima Taq DNA polimerase (Promega, USA). Os ciclos de temperatura utilizados foram: um ciclo de desnaturação de 4 min a 94 °C; 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C e 2.5 min a 72 °C; um ciclo final de extensão por 10 min a 72 °C. Para os fungos, a amplificação da região ITS foi realizada utilizando os iniciadores ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') para filamentosos (WHITE, T. J. et al., 1990) que permitem amplificar completamente as regiões ITS1 e ITS2. Para as leveduras foram utilizados os iniciadores ITS1 e NL4 (5' GGT CCG TGT TTC AA GAC GG 3') (O'DONNELL, 1993) que permitem amplificar a região D1/D2. A reação de amplificação seguiu o mesmo protocolo utilizado para bactérias. As condições de temperatura dos ciclos foram: uma etapa inicial de desnaturação a 94 °C, seguida de 30 ciclos de 30 seg a 94 °C, 30 seg a 52° C e 1 min a 72 °C, e uma etapa final de 5 min a 72 °C.).

A presença dos amplicons foi observada em gel de agarose 1% em tampão TBE 0,5X. Os géis foram submetidos à eletroforese de 80V em tampão TBE 0,5X durante aproximadamente 2 horas e visualizados através da luz UV em sistema de análise de imagem Fisher Scientifics (EUA). As bandas do gel foram purificadas através do kit GFX PCR DNA e Gel Band Purification kit (GE Healthcare) de acordo com o protocolo do fabricante. A quantificação dos produtos de PCR purificados foi realizada através do fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA). Os fragmentos amplificados foram enviados para a empresa Macrogen Inc. (Seoul, South Korea) para a realização do sequenciamento. Para as sequências de bactérias, os iniciadores 27f, 1492r, 532f (5'-CGT GCC AGC CGC GGT AA-3') e 907r (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') foram utilizados. Para fungos, ITS1 e ITS4 foram utilizados, enquanto ITS1, ITS4, NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') e NL4 foram utilizados para o sequenciamento dos amplicons de leveduras. O processamento das sequências foi realizado com o auxílio do programa Ribosomal Database Project Sanger Pipeline (RDP; <http://pyro.cme.msu.edu>), seguida da montagem com a utilização do programa Bioedit 7.0.5.355. Sequências de baixa qualidade foram removidas após seu processamento, e as demais foram submetidas à análise de similaridade de nucleotídeos no banco de dados do NCBI. As estirpes selecionadas para o consórcio foram depositadas no mesmo banco de dados.

4.4. Curva de crescimento bacteriano

Para realizar a curva de crescimento, foi necessário reativar as estirpes bacterianas que estavam armazenadas em glicerol no freezer -80 °C em placas contendo MA que foram incubadas a 26 °C, *overnight*. Para o crescimento de um pré-inóculo, colônias únicas foram inoculadas em 2 mL de meio MB e mantidas sob agitação contante a 26° C, *overnight*. Frascos de cultivo de volume de 250 mL contendo 100 mL de meio BH (com e sem 1% de óleo) foram previamente preparados e receberam 1% (v/v) do volume do pré-inóculo. Frascos para cada uma das linhagens testadas foram realizados

em triplicada, inclusive para os controles, e foram incubados sob agitação constante de 150 x g, a 26 °C. A cada 6 horas, alíquotas de 1 mL foram retiradas durante 48 horas para a medição da densidade óptica a 600 nm (UV-1800 Spectrophotometer, Shimadzu, Kyoto, Japan) e contagem de unidades formadoras de colônias (CFU). A contagem foi realizada com a de diluição seriada em solução salina a 0,85% (m/v) e plaqueamento em meio MA em triplicatas. O cálculo de número total de células foi um média das medidas em triplicatas e expressas em células/mL de cultura.

4.5. Teste de antagonismo

Os testes de antagonismo entre os isolados selecionados para a composição do consórcio microbiano degradador de óleo foram realizados em Placas de Petri contendo MEA e meio MB acrescidos de 2,5% de NaCl (Figura 25). Foram preparadas suspensões bacterianas e de leveduras e suspensões de esporos de fungos filamentosos. Para a realização do teste. Uma estria do isolado selecionado foi inoculada no centro da placa com o auxílio de alça de platina estéril e os micro-organismos a serem testados foram inoculados por estrias perpendiculares à estria central. As placas foram incubadas a 28 °C por até 7 dias e, após esse período, observações diárias foram realizadas quanto a presença de halo de inibição entre as bordas das colônias.

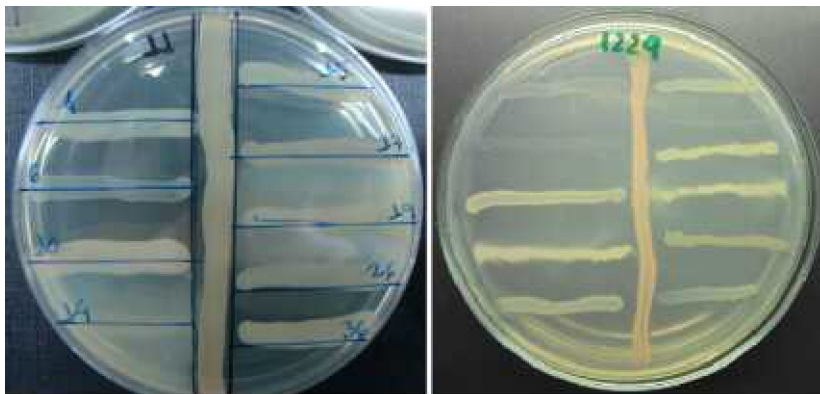


Figura 25: Teste de antagonismos de bactérias (A) e leveduras(B).

4.6. Experimento em mesocosmo

Este experimento foi descrito previamente no capítulo 1, representando o ensaio 2. Entretanto, no capítulo 1 foi utilizado somente os tratamentos óleo e controle afim de comparar com os tratamentos da primeira rodada experimental realizada para otimizar o sistema e o experimento. Neste capítulo, foi realizada a montagem do consórcio degradador de óleo e potencial probiótico, o delineamento experimental de uma forma mais ampla, mostra todos os tratamentos mostrando todos os tratamentos, assim como a a descrição de análise de nutrientes que não foram avaliados no capítulo 1, como o fosfato. Além disso, neste capítulo os estudos sobre o impacto dos fatores (óleo, Corexit 9500c e consórcio degradador de óleo) foi observado na *M. alcicornis* através da análise do bacterioma associado ao hospedeiro. Esta análise auxilia na compreensão do comportamento e a interação do bacterioma com o coral associado.

4.6.1. Preparo do consórcio degradador de óleo

Para a montagem e inoculação do consórcio degradador de óleo, os seis isolados bacterianos, uma linhagem de levedura e dois fungos filamentosos foram pré-inoculados o adicionado à frascos de cultivo de 250 mL contendo 150 mL de meio MB e incubados por 24 horas sob agitação constante de 150 x g a 25 °C. A produção da massa celular foi realizada em biorreatores com capacidade de 5 L com um sistema de borbulhamento (Figura 26) contendo 3 L de meio (MB para as bactérias e levedura e Meio de Extrato de Malte 2% com 2,5% de NaCl para os fungos filamentosos) recebendo ar filtrado de uma bomba com fluxo de 14 L. h⁻¹.

As culturas foram mantidas a 25 ± 3 °C durante 24 h para as bactérias e linhagens de levedura e 48 h para as linhagens de fungos. As culturas foram centrifugadas a 8000 x g por 8 minutos à 10 °C e a massa celular foi lavada 3 vezes em solução salina 0,85% (v/v). A massa celular de cada cultura individual foi ressuspensas em 500 mL solução salina 0,85% (v/v) por duas vezes e centrifugadas novamente para a lavagem das células. Ao final da lavagem, houve nova centrifugação e as células foram ressuspensas em 100 mL de solução salina a 2,5% de NaCl. A densidade óptica foi medida para estimar o

número de UFC, baseando-se na curva de crescimento de cada isolado descrito na seção 4.4.

Para confirmar a viabilidade e a concentração das células, foram realizadas plaqueamentos e contagem de UFC/mL (utilizando a câmara de contagem de Neubauer). O meio MA foi utilizado para contagem de UFC de bactérias e levedura e o meio Ágar Extrato de Malte com 0,005% de amoxicilina foi utilizado para a contagem dos fungos. Para isso, diluições seriadas foram realizadas em solução salina até a diluição de 10^{-12} . As colônias de bactérias foram contadas após 24h de incubação e as colônias de fungos após 48 a 72 horas de incubação. Em seguida a pureza e o crescimento dos isolados foram avaliadas através das técnicas de esgotamento em meio sólido, utilizando-se os mesmos meios sólidos e incubadas a 26 °C. O consórcio foi preparado no máximo com 2 dias de antecedência para garantir a viabilidade das células no experimento.

Abaixo, conforme mostra a figura 27, uma esquematização resumida das etapas de seleção do pBMC--BC até montagem.



Figura 26: Produção da massa celular dos isolados em biorreatores com capacidade de 5 L com sistema de borbulhamento.



Figura 27: Etapas do preparo do consórcio degradador de óleo: 1) Coleta do hidrocoral *Millepora alcicornis*; 2) Maceração dos fragmentos de coral; 3) Plaqueamento em meio seletivo contendo frações do óleo como única fonte de carbono; 4) Extração de DNA dos isolados selecionados; 5) Teste de antagonismo entre os isolados selecionados; 6) Montagem final do consórcio.

4.6.2. Delineamento experimental

Neste experimento foram avaliadas 8 condições diferentes de exposição dos fatores oWSF, consórcio microbiano degradador com potencial benéfico (pBMC-BC, do inglês *potential Beneficial Microorganisms to Corals – Biorremediator Consortium*), dispersante químico (Corexit 9500c) e as respectivas combinações ao longo do tempo e em quadruplicata (Tabela 2) (Figura 28).

Tabela 2. Tratamentos e condições experimentais.

Tratamentos	Condições	Abreviação
1	Controle (água do mar)	Ctrl
2	Óleo (1% v/v)	oWSF
3	Consórcio degradador de óleo	pBMC-BC
4	Óleo + Consórcio	oWSF + pBMC-BC
5	Dispersante (1:20)	Corexit 9500c
6	Dispersante + Consórcio	pBMC-BC + Corexit 9500c
7	Dispersante + Óleo	oWSF + Corexit 9500c
8	Dispersante + Consórcio + Óleo	oWSF + pBMC-BC + Corexit 9500c

* Do inglês *potential Beneficial Microorganisms to Corals – Biorremediator Consortium*;

** Do inglês *oil Water-Soluble Fraction*.

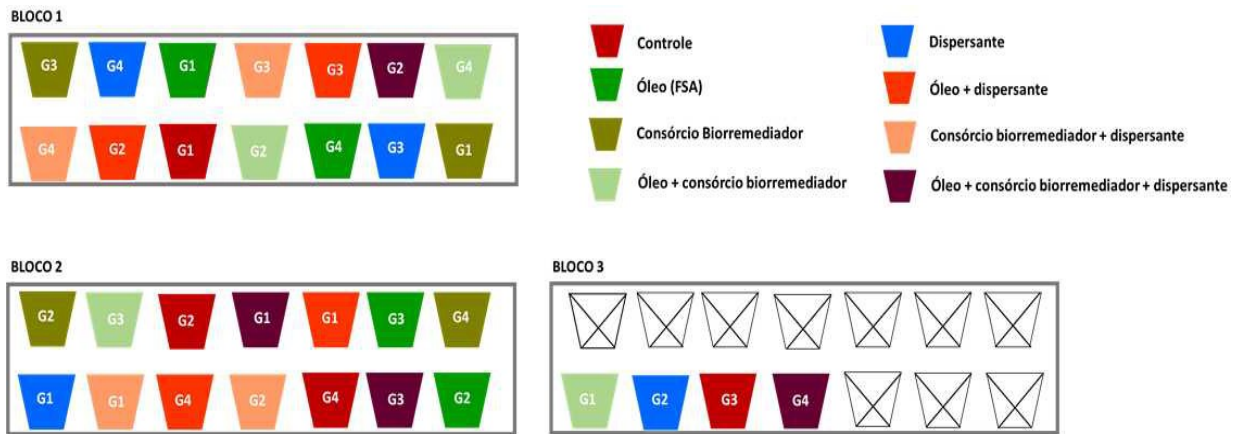


Figura 28: Representação do sistema de aquários em blocos casualizados utilizados no sistema de mesocosmo PROCORAIS.

A concentração de óleo escolhida foi de 1% (v/v) em 250 L de água do mar presentes nas caixas de estoque. Já a concentração do dispersante químico ficou na proporção de 1:20 de acordo com a resolução CONAMA N° 269 conferida pela Lei n° 6.938 e pelo Decreto n° 99.274. O pBMC-BC foi inoculado duas vezes ao longo do experimento (no 1° e 7° dia de experimento) a uma concentração de 10^6 células/mL. O tempo de duração deste experimento foi de 28 dias, dos quais 5 dias foram de recuperação de corais após a coleta, fragmentação e montagem dos fragmentos nos suportes (azulejos). Durante este período, o fluxo de água do mar nos aquários se manteve elevada (4X o volume do aquário por hora), para que os corais pudessem ter uma recuperação adequada. Após esta etapa, ocorreu a aclimação dos fragmentos durante 10 dias às condições experimentais, com a vazão de água até os aquários diminuiu para 0,5X o volume do aquário/h. Vale ressaltar que antes da aplicação do óleo e dos fatores de remediação as válvulas do sistema das caixas que conectavam as caixas de tratamento aos aquários foram fechadas, e a vazão de água foi mantida por uma caixa intermediária. Após a aclimação dos fragmentos no mesocosmo, iniciou-se a simulação do vazamento de óleo, aplicando o mesmo nas caixas de 250 L. Após 3 horas, a aplicação dos outros dos fatores de remediações química e biológica (Corexit 9500c e pBMC-BC) foram realizadas como resposta ao vazamento. Por 24 horas o sistema permaneceu fechado e esta etapa foi para simular o tempo que a mancha com os tratamentos demoraria para chegar a uma aos recifes de corais. Após este tempo, houve a reabertura do sistema e os fragmentos começaram a ser expostos tratamentos, este

dia foi chamado de 1º dia de exposição ou T₀, pois foi quando realizamos o primeiro tempo de coleta do material a ser analisado. Após o T₀, novas coletas foram realizadas no 4º dia de exposição (T₁) e no 13º e último dia de exposição (T₂). O pBMC-BC foi reinoculado no 7º dia de exposição. A esquematização do delineamento experimental, pode ser observada na Figura 30.

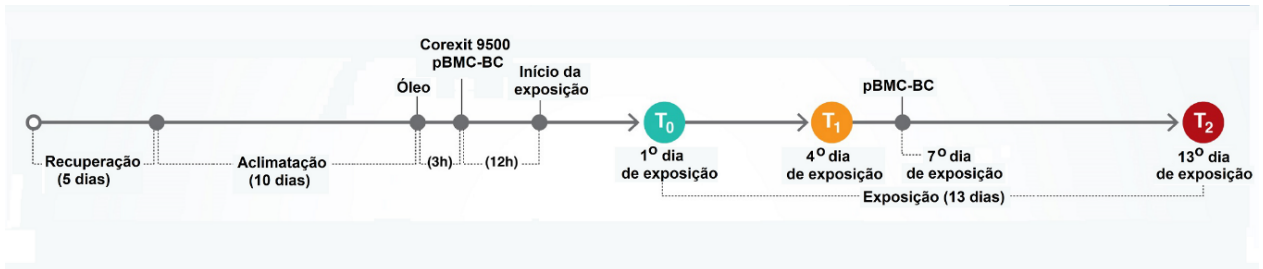


Figura 30: Esquematização do delineamento experimental.

4.6.2.1. Análise dos parâmetros físico-químicos

4.6.2.1.1. Temperatura, salinidade e pH

Essas análises foram descritas previamente no capítulo 1, na seção 4.1.4.1, analisados nos tempos de coletas representado pelo ensaio 2 da metodologia de validação do sistema de mesocosmo. Vale ressaltar que apenas os tratamentos Controle (Ctrl) e óleo (oWSF) foram citados anteriormente. Entretanto, essas análises foram aplicadas também para os outros tratamentos com oWSF, pBMC-BC, Corexit 9500c e as respectivas combinações citadas anteriormente.

4.8.2.1.2. Quantificação de nutrientes e carbono orgânico dissolvido (COD)

As análises de compostos nitrogenados (nitrito, nitrato e Amônia) foram descritas previamente no capítulo 1, na seção 2.2.3.2. A análise de COD também foi descrita anteriormente, na seção 2.2.3.3 analisados nos tempos de coletas representado pelo ensaio 2 da metodologia de validação do sistema de mesocosmo.

4.8.2.1.3. Quantificação de fosfato

Amostras de água do mar foram coletadas dos aquários e filtradas em membranas

de celulose (tamanho de poro de 0,45 μm e diâmetro de 47 mm) para análises de fosfato. Estas amostras foram armazenadas em frascos âmbar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ e as análises foram realizadas pelo Laboratório de Análises Ambientais do Instituto de Biologia da UFRJ, através do FIAstar® 5000 (Foss Analytical, Höganäs, Suécia) por processo de injeção de fluxo seguindo a metodologia 5012 (*application note*) do fabricante e certificada pela ISO 25682-2. As amostras foram coletadas no T0 (1° dia), T1 (4° dia) e T2 (13° dia) de experimento.

4.8.2.1.4. Quantificação de hidrocarbonetos de petróleo

A metodologia para a quantificação de hidrocarbonetos alifáticos e aromáticos foi descrita anteriormente no capítulo 1, na seção 2.2.3.4. Neste experimento, foram analisados a presença e a quantificação dos hidrocarbonetos em todos os tratamentos, incluindo controle. As coletas foram coletadas no T0 (1° dia), T1 (4° dia) e T2 (13° dia) de experimento.

4.8.2.2. Capacidade fotossintética máxima do fotossistema II das algas simbióticas fotossintéticas (F_v / F_m)

A eficácia do mesocosmo foi avaliada com base nos valores de máximo rendimento quântico fotossintético (F_v/F_m), que servem como uma estimativa da saúde das algas fotossintéticas associadas e podem inferir diretamente o estado fisiológico dos corais nos tratamentos. As medições de F_v/F_m realizadas ao mesmo tempo e frequência que os parâmetros físicos e químicos. Os parâmetros fotossintéticos das algas foram medidos durante o experimento com auxílio de um pulso sub-aquático e fluorômetro modulado em amplitude (Diving-PAM; Heinz Walz, EffeLtrich, Alemanha) com a seguinte configuração: Medindo a Intensidade da Luz (MI) = 6; Intensidade de pulso de saturação (SI) = 8; Largura de pulso de saturação (SW) = 0,8; Ganho (G) = 1; Amortecimento (D) = 1. Para evitar interferência de artefatos diurnos de fotoinibição, as medidas foram tomadas 1 hora após o pôr do sol para garantir a recuperação completa dos centros de reação. A intensidade da radiação fotossinteticamente ativa em cada aquário foi medida

usando um sensor de fibra quântica (1 mm de diâmetro) conectado ao Diving-PAM. Posicionamos a sonda no tecido do pólipo do hidrocoral, usando um pólipo aleatoriamente selecionado por aquário, e o mesmo fragmento de coral (de cada réplica), foi usado para medir a fluorescência da clorofila em diferentes épocas de amostragem. Os hidrocorais foram aclimatados no escuro por 20 min, pois esse período escuro resulta no desaparecimento dos processos não fotoquímicos a partir da dissipação da energia de excitação do fotossistema II.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi determinado a partir dos valores de fluorescência, denominados F_o e F_m . 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 pela exposição a um pulso de luz saturante, $6.000 \mu\text{mol de f\u00f3tons m}^{-2}\text{s}^{-1}$ na presença de luz modulada. A diferença entre estes valores extremos corresponde ao valor de fluorescência vari\u00e1vel (F_v) e a rela\u00e7\u00e3o F_v / F_m representa a efici\u00eancia qu\u00e2ntica m\u00e1xima do fotossistema II.

4.6.3. An\u00e1lises estat\u00edsticas dos par\u00e2metros f\u00edsico-qu\u00edmicos e F_v/F_m

As an\u00e1lises estat\u00edsticas de medidas repetidas (ANOVA de medidas repetidas) foram realizadas para todos os par\u00e2metros, incluindo F_v/F_m , com a utiliza\u00e7\u00e3o do pacote nlme (PINHEIRO et al., 2017) o software estat\u00edstico R (TEAM, 2017). Para tal an\u00e1lise, foi utilizada a fun\u00e7\u00e3o lme para se criar um modelo de efeitos misto, no qual tempo e tratamento s\u00e3o efeitos interativos fixados, enquanto a identidade dos aqu\u00e1rios s\u00e3o efeitos rand\u00f4micos. Ap\u00f3s esta etapa, um teste post-hoc foi realizado para estimar as m\u00e9dias dos m\u00ednimos quadrados e para identificar intera\u00e7\u00f5es emparelhadas com signific\u00e2ncia estat\u00edstica ($p < 0,05$) entre tempo e tratamento (lsmeans package) (LENTH; LENTH, 2018) com testes de Tukey. Os dados f\u00edsico-qu\u00edmicos foram transformados para log quando necess\u00e1rio para se adequarem a padr\u00f5es de normalidade e homocedasticidade dos res\u00edduos do modelo.

4.6.4. An\u00e1lise do bacterioma associado ao hidrocoral *M. alcicornis*

4.6.4.1. Processamento de amostra e extra\u00e7\u00e3o de DNA total da *M. alcicornis*

Fragmentos de 0,5 g de *M. alvicornis* foram cortados com alicate esterilizado a cada fragmento através de flambagem, coletados em todos os tempos de experimento, em criotubos e imediatamente armazenados em nitrogênio líquido para a preservação do material genético. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido com auxílio de grau pistilo. DNA total foi extraído com a utilização do kit PowerSoil™ DNA Isolation (MoBio™, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. O DNA total foi quantificado utilizando-se o fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, USA).

4.6.4.2. Preparação das bibliotecas e sequenciamento do RNAr do 16S

Para o sequenciamento, a região variável V4 do gene que codifica o RNAr do 16S foi selecionada como alvo, e os iniciadores 515F (5'-GTG CCA GCM GCC GCG GTA A 3 ') e 806R (5' GGA CTA CHV GGG TWT CTA AT 3 ') (CAPORASO et al. 2011) foram utilizados para a amplificação de etapa única. O kit AccuStart ToughMix II (Quanta BioSciences, Gaithersburg, Maryland, USA) foi utilizado para a reação. As condições de amplificação foram: desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, 50 °C por 60 segundos e 72 °C por 90 segundos, seguidos de uma etapa final de extensão a 72 °C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em eletroforese em gel de agarose (1,5%) e revelado com solução gel-red (Invitrogen, USA). Após a verificação dos produtos de PCR, amostras foram purificadas com o kit Agencourt Ampure XP (Roche Molecular Systems), seguindo as recomendações do fabricante. As bibliotecas multiplexadas foram, então, submetidas ao Centro Genômico da Universidade de Oregon e Centro de Pesquisa e Biocomputação da Oregon State University, Corvallis - Oregon USA - para sequenciamento utilizando-se a plataforma Illumina MiSeq (Illumina, Inc.).

4.6.4.3. Análises de bioinformática

As sequências brutas obtidas no sequenciamento foram analisadas com a utilização do programa Mothur (SCHLOSS et al., 2009) versão 1.39.5. Após a retirada dos barcodes de sequenciamento e primers tanto das sequências senso quanto anti-

senso, as sequências complementares foram pareadas e unificadas em contigs. Os contigs com menos de 290 e maiores que 352 pb, sem ambiguidade e contendo mais do que 8 homopolímeros, foram removidos. As sequências remanescentes foram alinhadas utilizando-se a base de dados SILVA como referência. O comando “screen.seqs” (Mothur versão 1.39.5) foi utilizado com o intuito de remover sequências com baixa qualidade de alinhamento, enquanto o comando “filter.seqs” foi realizado para homogeneizar o alinhamento e remover colunas de alinhamento sem informação.

As sequências foram pré-agrupadas com a utilização do comando “pre.cluster” (Mothur versão 1.39.5), a fim de se reduzir ruídos e permitindo no máximo duas diferenças entre as sequências, utilizando-se o parâmetro $\text{diffs} = 2$. Para melhorar a qualidade das sequências, quimeras foram detectadas e eliminadas com a utilização dos comandos “chimera.vsearch” (Mothur versão 1.39.5) e “remove.seqs” (Mothur versão 1.39.5). Sequências foram classificadas com o comando “classify.seqs” (Mothur versão 1.39.5) e a base de dados *Ribosomal Database Project* (RDP) 16S rRNA versão 16, foi utilizada como referência. O valor de bootstrap utilizado foi 80. Todas as sequências identificadas como sendo de cloroplasto, eucarioto, mitocôndria e arqueia, foram removidas, e as remanescentes agrupadas em OTUs (do inglês, *Operational Taxonomic Units*), com dissimilaridade de 3%. Todas as amostras foram normalizadas para conterem o mesmo número de sequências (5371). A distribuição de OTUs juntamente com os metadados de NO_2 , NO_3 , NH_4 , HPAs, *Fv/Fm*, e a presença dos fatores Corexit 9500c, oWSF e pBMC-BC, foram utilizados para a realização do NMDS (do inglês, *non-parametric multidimensional scaling*) usando-se o índice de similaridade de Bray-Curtis para a avaliação das relações entre as amostras e os parâmetros físico-químicos ao longo do experimento. A análise estatística deste teste foi realizada com o programa *Paleontological Statistics Software* (PAST) versão 3.20. O índice de Shannon, Chao e número de OTUs foram calculados pelo programa Mothur versão 1.39.5 e analisado no programa PRIMER-e (GUTIÉRREZ et al., 2018) (versão 7) utilizando-se o teste ANOVA de três vias. O teste PERMANOVA de três vias foi utilizado para se avaliar a diferença na composição estrutural dos tratamentos. Para essa análise foi utilizado o programa PRIMER-e (versão 7).

Para avaliar os impactos dos fatores (oWSF, Corexit 9500c e pBMC-BC) na

abundância relativa das OTUs, o teste *Indicator Species Analysis* bloqueado (DUFRENE; LEGENDRE, 1997) foi realizado com a utilização do software PC-ORD (MCCUNE; MEFFORD, 2011) versão 6.0. Esta análise determina um valor indicativo de influência de fator para cada OTU, que pode variar de 0 (não indicativo) a 100 (muito indicativo). Um valor indicativo de 100 ocorre quando uma OTU está presente em alta abundância relativa em todas as amostras em que um determinado fator está presente, e ausente por completo quando ele não está. Um valor indicativo 0 ocorre quando a distribuição da OTU é igual na presença ou ausência de determinado fator. Adicionalmente, um valor de significância é gerado por um teste de Monte Carlo, que avalia se a ocorrência da distribuição é randômica ou não. Para este estudo, consideramos apenas as OTUs com valor indicador acima de 60, $p < 0,05$, e abundância relativa $> 0,1\%$. Um esquema resumido das etapas da análise do bacterioma da *M. alvicornis* é mostrado abaixo (Figura 30).

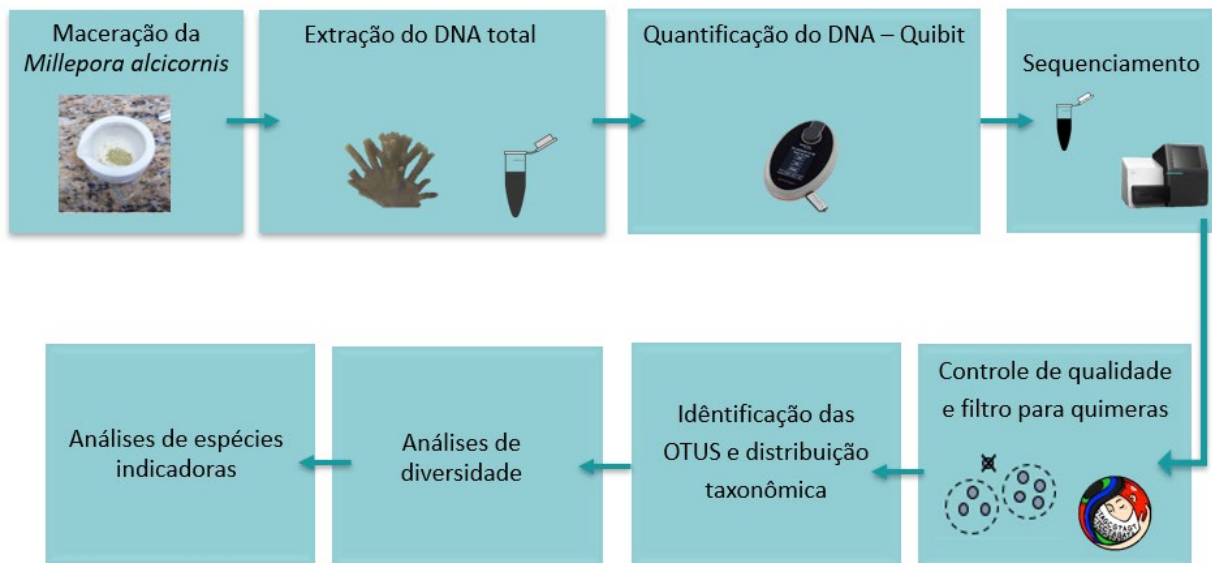


Figura 30: Esquema da análise do bacterioma do hidrocoral *M. alvicornis* baseado no sequenciamento do 16S rRNA.

5. RESULTADOS / ARTIGOS

5.1. Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals

Publicado na Revista **Ecology and Evolution**, v. 9, p. 5172-5185, 2019, doi
10.1002/ece3.509

Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals

Denise P. Silva^{1*}  | Gustavo Duarte^{1,2*} | Helena D.M. Villela¹ | Henrique F. Santos¹ |
 Phillipe M. Rosado¹ | João Gabriel Rosado¹ | Alexandre S. Rosado¹  | Edir M. Ferreira¹ |
 Adriana U. Soriano³ | Raquel S. Peixoto^{1,2} 

¹LEMM, Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

²IMAM-AquaRio – Rio de Janeiro Aquarium Research Center, Rio de Janeiro, Brazil

³Biotechnology Section, Leopoldo Américo Miguez de Mello Research & Development Center – CENPES, PETROBRAS, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence

Raquel S. Peixoto, Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Rio de Janeiro, Brazil.
 Email: raquelpeixoto@micro.ufrj.br

Present Address

Henrique F. Santos, Department of Marine Biology, Fluminense Federal University, Rio de Janeiro, Brazil

Funding information

This contribution is part of the PROCORAIS Project sponsored by CENPES/PETROBRAS, agreement number 0050.0090605.14.9, regulated by ANP, the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP Resolution 05/2015).

Abstract

Although numerous studies have been carried out on the impacts of oil spills on coral physiology, most have relied on laboratory assays. This scarcity is partly explained by the difficulty of reproducing realistic conditions in a laboratory setting or of performing experiments with toxic compounds in the field. Mesocosm systems provide the opportunity to carry out such studies with safe handling of contaminants while reproducing natural conditions required by living organisms. The mesocosm design is crucial and can lead to the development of innovative technologies to mitigate environmental impacts. Therefore, this study aimed to develop a mesocosm system for studies simulating oil spills with several key advantages, including true replication and the use of gravity to control flow-through that reduces reliance on pumps that can clog thereby decreasing errors and costs. This adaptable system can be configured to (a) have continuous flow-through; (b) operate as an open or closed system; (c) be fed by gravity; (d) have separate mesocosm sections that can be used for individual and simultaneous experiments; and (e) simulate the migration of oil from ocean oil spills to the nearby reefs. The mesocosm performance was assessed with two experiments using the hydrocoral *Millepora alcicornis* and different configurations to simulate two magnitudes of oil spills. With few exceptions, physical and chemical parameters remained stable within replicates and within treatments throughout the experiments. Physical and chemical parameters that expressed change during the experiment were still within the range of natural conditions observed in Brazilian marine environments. The photosynthetic potential (F_v/F_m) of the algae associated with *M. alcicornis* decreased in response to an 1% crude-oil contamination, suggesting a successful delivery of the toxic contaminant to the targeted replicates. This mesocosm is customizable and adjustable for several types of experiments and proved to be effective for studies of oil spills.

KEYWORDS

coral reef, flow-through system, marine mesocosm, marine pollution, *Millepora alcicornis*, oil spill

*These authors contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

© 2019 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.

1 | INTRODUCTION

Coral reefs are sensitive biological communities with high biodiversity and productivity (Ainsworth, Thurber, & Gates, 2010; Richmond, 1993) that play a critical role in the trophic interactions and connectivity of marine ecosystems (S awstr om et al., 2016). They also have high economic value for local communities, for instance through fishing and tourism (Spalding et al., 2017). Despite their ecological and economical importance, coral reefs are experiencing serious declines and impacts caused by different factors, including anthropogenic stressors, such as climate change, sedimentation, and pollution (Hughes et al., 2018; Leite et al., 2018; Liu, Meng, Liu, Wang, & Leu, 2012; Nepote, Bianchi, Chiantore, Morri, & Montefalcone, 2016; Nyström, Folke, & Moberg, 2000; Reichelt-Brushett & Harrison, 1999). These disturbances can, independently or synergistically, induce coral mortality, contribute to disease outbreaks, and affect coral reproduction and recruitment (Muthukrishnan & Fong, 2014; Richmond, 1993; Richmond, Tisthammer, & Spies, 2018).

Oil spills have been affecting reef ecosystems for decades. In view of the high demand for petroleum products, there is a need to increase crude-oil extraction, and accidental leaks can occur throughout the production chain from offshore platforms, distribution pipelines, and tankers. Corals can be impacted by these spills due to the rapid incorporation of the water-soluble fraction (WSF) of oil (NOAA, 2010; Turner & Renegar, 2017). Sublethal effects of oil contamination on corals can also include decreased growth rates (Guzmán & Holst, 1993; Guzmán, Jackson, & Weil, 1991; Prouty, Fisher, Demopoulos, & Druffel, 2014; Xu et al., 2018); the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in coral tissue, which can cause bleaching (Harrison, Collins, & Alexander, 1990; Ko, Chang, & Cheng, 2014); excessive mucus production (Hsing et al., 2013); shifts in the composition of the coral microbiome (Santos et al., 2015); and decreases in settlement and development of coral larvae (Epstein, Bak, & Rinkevich, 2000; Loya & Rinkevich, 1979). DeLeo, Ruiz-Ramos, Baums, and Cordes (2015) demonstrated the toxic effects of oil and dispersants—a chemical remediation strategy largely applied in oil spills—on three deep-water coral species: *Paramuricea* type B3, *Callogorgia delta*, and *Leiopathes glaberrima*. Ruiz-Ramos, Fisher, and Baums (2017) also showed that oil that had been previously dispersed by chemical remediation was harmful to black coral *L. glaberrima* as evidenced by enhanced expression of coral microbiome genes associated with stress. Santos et al. (2015) also demonstrated the negative effect of oil on the photosynthetic capacity of the coral-associated symbiotic algae, often used as an indirect proxy for coral health. Field studies provide the best opportunity to simulate complex dynamics of contaminants within environments to understand the effects of oil spills under realistic conditions (Culp & Baird, 2006; NOAA, 2010) and to test mitigation strategies. However, the number of uncontrolled variables in field studies and eventual lack of reliable control areas can make

it difficult to disentangle the consequences of oil pollution from other environmental factors in marine environments (Adams, 2003). In addition, field experiments where toxic contaminants are released into the environment must be avoided when possible or extremely well contained.

Micro and mesocosms, which are structures of various sizes (capacity 1 L to >10,000 L), can be used to understand the effects of different stressors on corals (Petersen, Cornwell, & Kemp, 1999; Putnam, Barott, Ainsworth, & Gates, 2017; Reilly, 1999). Field conditions can be reproduced by mesocosms that use specially designed equipment to control and manipulate chemical and physical parameters that mimic natural environmental conditions (Duarte et al., 2016; Lockett, Adey, Morrissey, & Spoon, 1996; Odum, 1984). For a mesocosm system to be considered acceptable, it must provide similar conditions to the natural environment, true replication over time, self-sustaining conditions, and the establishment of a representative biological community (Alexandre, Luiker, Finley & Culp, 2016; Riebesell, Fabry, Hansson, & Gattuso, 2010). The advantages of using mesocosms include better reproduction of environmental conditions compared to laboratory bioassays and high-quality, reproducible data which are easier to collect and interpret than in conventional field studies. For instance, Duarte et al. (2016) designed a mesocosm to study the impacts of heat stress and acidification on corals. The authors found that the mesocosm system allowed the measurement of ecological, biological, and physiological stress responses of corals to a variety of environmental parameters. In addition, mesocosms are very versatile and can be adapted to work with a variety of stressors. However, there are some limitations, such as the use of water pumps, which can fail, and the existence of some degree of pseudoreplication due to drawing water from a common stock tank.

Here, we describe a new, realistic mesocosm system that is low cost yet can be effectively controlled to understand the effects of oil spills on corals. This system can also be used to further develop and test potential remediation strategies, taking into consideration the importance of maximizing the reproduction of natural conditions and the use of true replicates. In addition, we demonstrate how this system improves the known limitations of previously described mesocosms, such as the dependency of pumps to control flow, thereby reducing costs and avoiding clogs. This system can be adapted for other experiments with or without oil, among others. Finally, we evaluated the efficacy of the mesocosm design by conducting two experiments with different configurations: (a) a continuous flow-through and open system, fed by gravity with seawater recirculation in storage tanks and dilution of contaminants, and (b) a continuous flow-through and open system, fed by gravity using seawater from contaminant tanks without recirculation in storage tanks and without dilution of contaminants. These configurations allowed us to simulate two different situations of coral exposure to a crude-oil spill with (a) diluted or low-magnitude contamination and (b) with direct exposure to a large and acute oil spill.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Ethics approval and consent to participate

Permission to collect *Millepora alcicornis* was obtained from the Municipal Secretary of the Environment and Fish of Armação dos Búzios, license numbers 0093/2014 and 007/2015. The microbial survey permit was obtained from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and SisGen number A620FE5.

2.2 | PROCORAIS Mesocosm

The PROCORAIS Mesocosm was located at the Center for the Study of Oil Bioremediation in Marine Environments, a joint initiative of Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ) and Petrobras Research & Development Center (CENPES), in the city of Armação dos Búzios (22°45'44.22"S; 41°53'3.97"W), state of Rio de Janeiro, Brazil (Figure 1). Natural sunlight was chosen to reproduce the light spectrum experienced by corals. The location and best position to replicate natural light conditions within the structure were selected using SketchUp Pro software (Trimble Navigation Limited, 2015), which made it possible to analyze the profiles of shadows of nearby buildings and variations in luminosity throughout the year in this area.

The mesocosm can be configured to (a) have continuous flow-through, (b) operate as an open or closed system, (c) be fed by

gravity, avoiding pump clogging, (d) have independent mesocosm sections that can be used separately in simultaneous experiments, and (e) simulate the migration of oil from ocean oil spills to nearby reefs. The mesocosm can hold up to 13 treatments (52 independent stock tanks and 52 independent dilution tanks in total) with four replicates each, with the option to reconfigure the system for fewer treatments with greater replication. This mesocosm system is partitioned into three sections: (a) seawater storage, (b) contaminant stock (representing the open ocean where the oil spill and weathering would occur), and (c) experimental aquariums (representing the "reefs"). A schematic flowchart of the mesocosm system is shown in Figure 2. The path from the tanks to the aquariums represents the path of contaminated water from the spill area to the reef.

2.2.1 | Seawater storage section

Seawater flows continuously between two 20,000-L polyethylene storage tanks (Fortlev[®], Camaçari, Bahia, Brazil) at ground level and a 300-L drop-down polypropylene tank (Moar Plásticos[®], São Paulo, São Paulo, Brazil) 6 m above the ground (Figures 2 and 3). From the first storage tank, seawater is drawn to the second 20,000-L polyethylene storage tank through a 60-mm-diameter overflow pipe (Tigre[®], Joinville, Santa Catarina, Brazil) which gravity-feeds seawater to the contaminant tanks through 4 PVC pipes (Figures 2 and 3). Excess seawater from the drop-down tank is recirculated to the two

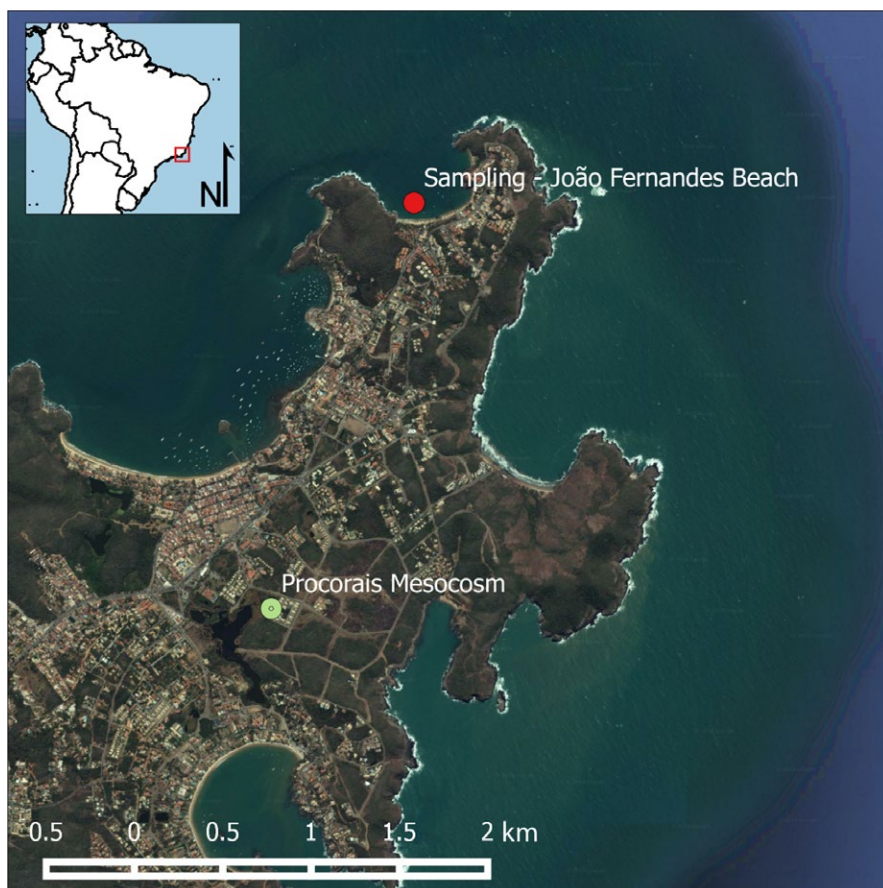
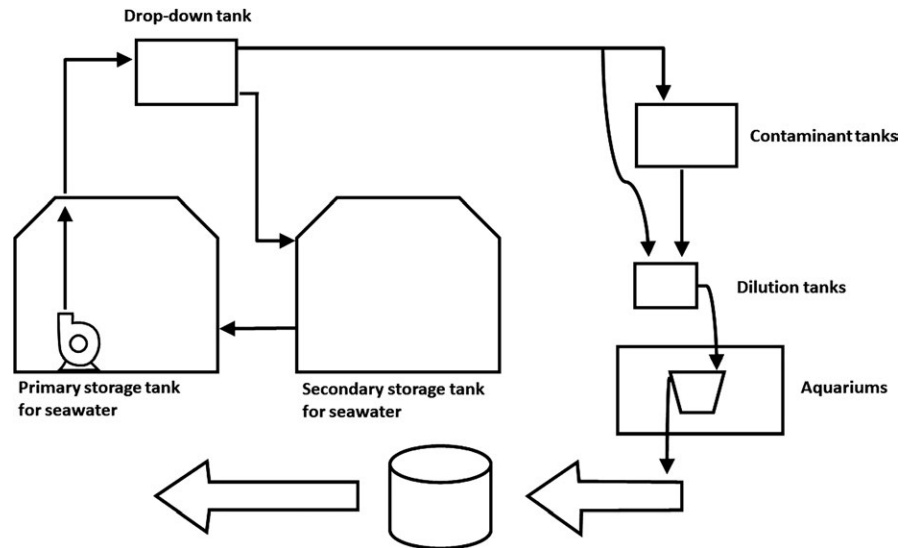


FIGURE 1 Map of the location of João Fernandes, Beach (22°44'29.95"; 41°52'35.62"W), and the PROCORAIS mesocosm (22°45'44.22"S; 41°53'3.97"W), Armação dos Búzios, Rio de Janeiro

FIGURE 2 Schematic flowchart of seawater flow in the mesocosm system. Seawater is stored in the primary and secondary tanks and pumped to the drop-down tank. By gravity, the water flows from the drop-down tank and is distributed to the contaminant tanks. The dilution tanks receive the treatments and by gravity supply the aquariums with corals. The continuous experimental waste flow is collected by a single pipe, which feeds into a wastewater treatment system



20,000-L tanks to ensure oxygenation and homogeneous conditions within the entire storage and distribution system. The system uses a single 20,000 L/hr water-lift pump (JEBO Lifetech Sp620, Monterey Park, California, USA) in the seawater storage section. By distributing fluids through gravity feed, the system avoids clogging, a common problem in experimental work with hydrocarbons. In addition, the use of a single pump reduces implementation and maintenance costs, factors that can be constraining in mesocosm systems. Finally, the gravity-feed distribution tank provides a fail-safe for the system because seawater can continue to flow if the single pump fails and a replacement must be installed.

2.2.2 | Stock of contaminants

The section housing contaminant stocks (Figure 2) was composed of up to 52 (maximum capacity of the mesocosm) 300-L polypropylene contaminant tanks (Moar Plásticos®, Campinas, São Paulo). These tanks were housed on three platforms 3 m above the ground. Each stock tank was paired with a 26-L polypropylene dilution tank (Moar Plásticos®, Campinas, São Paulo) that was also gravity-fed and had an air bubbler to better homogenize the treatments. The 26-L dilution tanks were also connected directly to a 300-L drop-down tank containing pure seawater. Thus, the contaminant concentration could

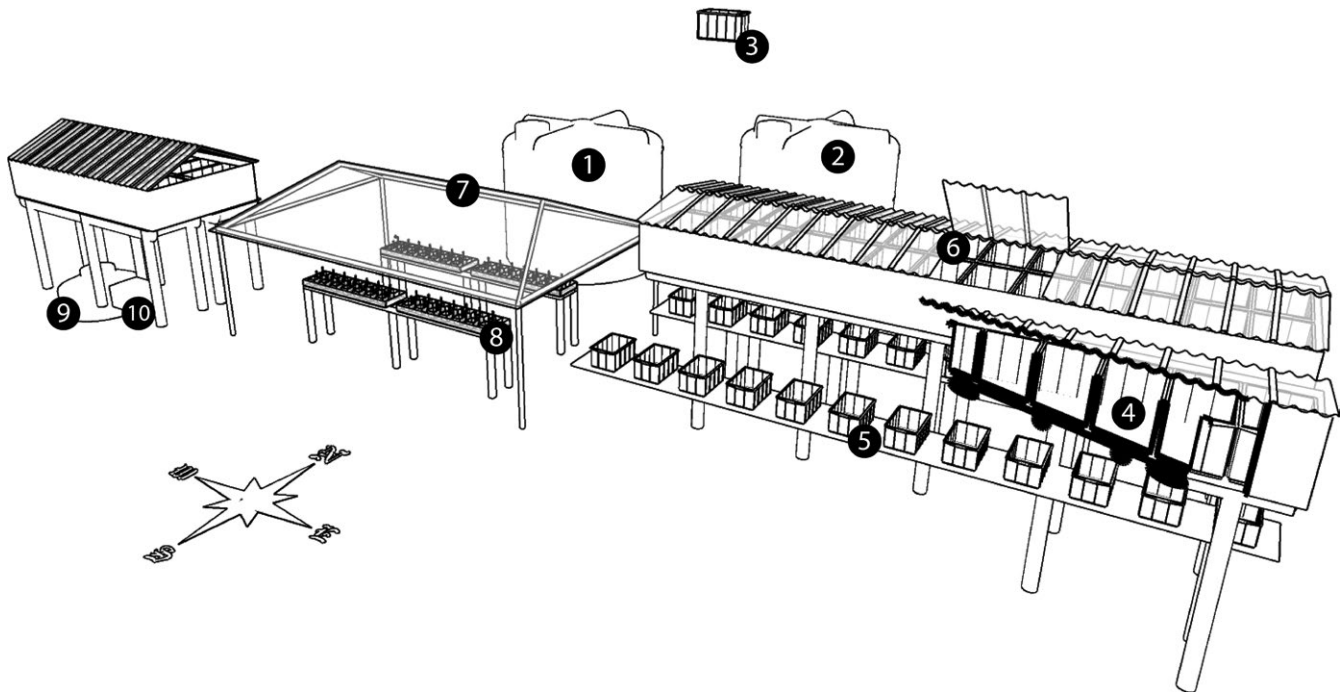


FIGURE 3 Plan of the mesocosm system: *Seawater storage section*: primary seawater storage tank (1), secondary seawater storage tanks (2), drop-down tank (3); *Contaminant stock section*: Contaminants tanks (4) and dilution tanks (5); *Experimental aquariums section*: polycarbonate roof (7); aquariums and water baths (8); cold-water reservoir (9) and Chiller unit (10)

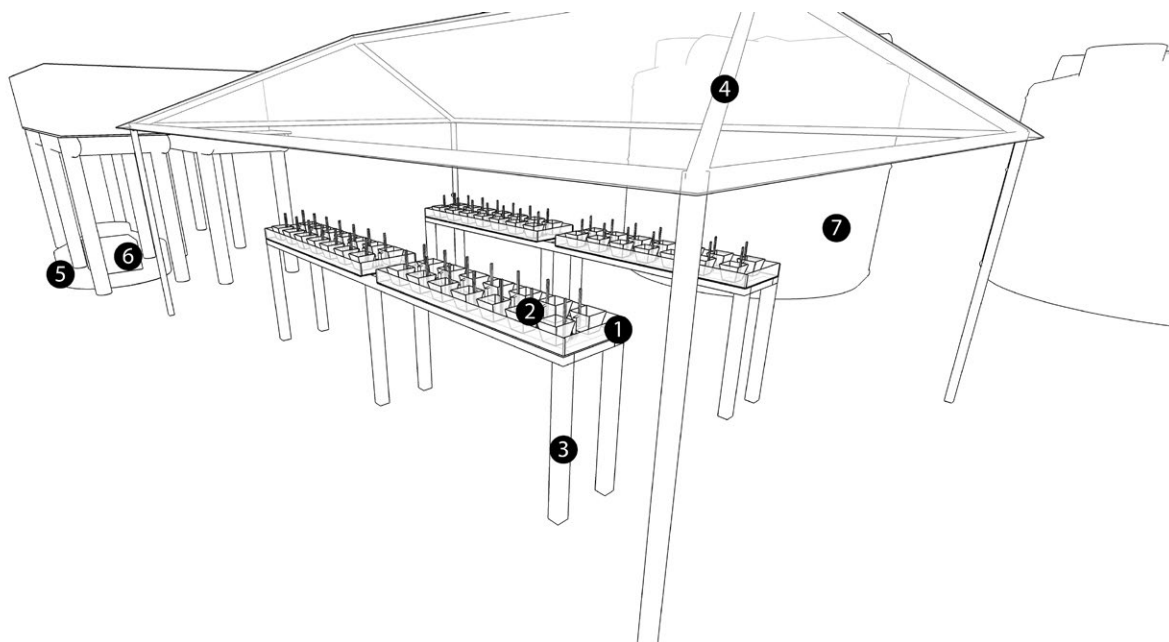


FIGURE 4 Schematic view of the experimental aquarium section (1), experimental aquariums (2); water-bath stands (3); polycarbonate roof (4); cold-water reservoir (5); chiller unit (6); two 20,000-L stock-water reservoirs (7)

be adjusted precisely by controlling the flow from the distribution and stock tanks to the dilution tanks. Water levels in all stock and dilution tanks were maintained with a float switch to simulate the gradual release of the WSF fraction of the oil into the water column, according to dilution observed in marine systems, rendering the oil concentration lower over time. All dilution tanks had an air bubbler to homogenize the dilution. All tanks were maintained at ambient air temperature.

The dilution tanks also had an overflow connected to a short section of 6.5-mm polyethylene hose (internal diameter; Rubberplastic, Cajamar, São Paulo) that was in turn connected to a 4.35-mm polyethylene hose (internal diameter; Rubberplastic, Cajamar, São Paulo). This hose supplied contaminated seawater to the experimental aquarium section (Figure 2) that was connected to a last hose that fed the aquariums and controlled the entire flow of the system. This last hose was made of silicone (1.02 internal and 2.16 external diameter; Elastim, São Paulo) and provided a precise flow of 4.8 L/hr. The natural-seawater intake system had a flow valve (3 × 3 × 3.5 cm; Mr. PET, Ipiranga, São Paulo) to allow the dilution to be adjusted by setting the compound concentration in the contaminant tanks as well as the incoming saltwater-flow dilution tanks.

2.2.3 | Experimental aquariums section

The experimental aquariums section (Figures 2 and 4) of the mesocosm received seawater and the seawater-oil mixture from the dilution tanks. This section was composed of four water baths, each with an independent temperature control. In each water bath, up to 13 aquariums could be arranged, for a total of 52 aquariums. Each aquarium contained a small platform to facilitate sample and data collection with analytical instruments (e.g., the probes for measuring physical and chemical parameters). Each aquarium also had an

individual air bubbler to mix the water and remove excess coral mucus that is produced in response to the contaminant (Mitchell & Chet, 1975), reducing the boundary-layer effect. The mesocosm structure, including aquariums, was covered with a polycarbonate roof, and the luminosity was regulated with a 70% shade cloth (30% transmitted light; Equipisca, Campinas, São Paulo). The intensity of light that the aquariums received was $106.45 \pm 1.95 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and was measured with an LI-250 light meter with an LI-190SA sensor (Li-Cor, Lincoln, Nebraska, USA).

Each aquarium had an overflow that allowed the water received from the dilution tank to flow to a single wastewater treatment system. This wastewater treatment system was composed of an oil and water separator (ZP5000, Zeppini, São Bernardo do Campo, São Paulo) connected to an activated carbon filter (BOYU, Guangdong, China) for dissolved hydrocarbon retention. All water in the PROCORAIS Mesocosm system (including controls) was recovered, treated, and postdisposed in the conventional sewage system. Oil residues were stored and sent to the nearest point of collection and treatment. The wastewater treatment system had the capacity to receive 800 L/hr of water and 5 L/hr of oil which complied with the requirements of ABNT 14605-2 NBR standards (ABNT, 2010) and the Federative Brazilian Regulation, CONAMA 430 (CONAMA, 2011).

Aquariums were immersed in the water bath and used a two-part system to control and maintain temperatures (MT - 518Ri; Full Gauge Controls, Canoas, Rio Grande do Sul, Brazil). The temperature-control sensor was placed in one randomly selected experimental aquarium in each of the four water baths. For water cooling, the mesocosm was connected to a 1,000-L tank that was partly buried to take advantage of the thermal soil capacity to maintain water temperature. This stock tank was filled with 800 L of fresh water

and connected to a water chiller with a titanium coil tube (Chiller 1/4 HP; Gelaqua, Santos, São Paulo) to maintain the fresh water reservoir at 18°C. This stock tank was connected to a 2000 L/hr pump (SB-2000; Sarlo Better, São Paulo, São Paulo) that sent cold water to the water baths when the temperature controller was triggered.

2.3 | Mesocosm validation

To validate the PROCORAIS Mesocosm for studying the effect of crude-oil contamination on corals, two trials were performed with different configurations of the system. In both trials, our aim was to verify that the system could emulate realistic environmental conditions while maintaining consistent control on abiotic factors within replicates of differing treatments. The trials were conducted in April 2016 and April 2017 and were both run as open continuous flow-through systems. During the interval between the experiments, all tanks and aquariums were cleaned and all 4.35-mm- and 6.5-mm-diameter hoses were replaced. Both experiments used Marlim crude oil from the Campos Basin (Rio de Janeiro, Brazil). Seawater (CTRL) and crude oil (O) treatments were applied in both configurations (1 and 2), in quadruplicate as follows.

2.3.1 | Trial 1 (April, 2016)

In trial 1, our aim was to test the ability of the mesocosm for detecting impacts of the WSF of oil on the hydrocoral *M. alcornis* under conditions that emulate an oil spill being naturally diluted by water currents. This trial was designed to simulate gradual release of oil to the water column at a dilution observed in natural systems (ocean water) reproducing a pulse of contaminated water to the reef that would slowly become less contaminated after some time. To achieve these conditions, the mesocosm was configured with continuous flow-through as an open-system experiment fed by gravity in the entire mesocosm. The gravity-fed water flow was controlled by the small tanks between the 300-L tanks and the aquariums. These intermediate tanks had a controlled water level that allowed the weight of the water column to be constant. The seawater was stored in the 20,000-L tanks (seawater storage section) and the 300-L tanks were refilled constantly in the controls and treatments. Marlim crude oil was added to the oil-treatment tanks, which were diluted 10 times in the dilution tanks to reach a final concentration of 0.07% (v/v). The experiment was run for 30 days, with 9 days to acclimate the corals in the mesocosm and 21 days for the experiment. The physical, chemical, and biological parameters were measured every 2 days in the beginning and every 3 days after day 12 of experiment.

2.3.2 | Trial 2 (April, 2017)

In the second trial, our aim was to test the ability of the system to deliver a constant pollutant concentration to the aquariums throughout the experiment to test the effects of acute and

constant oil contamination on corals. In this configuration, the following adjustments were carried out relative to trial 1. First, a higher concentration of Marlim crude oil (1%; v/v) was added to a final volume of 250 L of seawater in the contaminant tanks. Second, the treatments were not diluted in this trial, in order to simulate a high-magnitude spill and increase the concentration of soluble hydrocarbons in the water. Instead, dilution tanks were used only to maintain the volume of water and allow the flow, by gravity, to be constant, even with the volume of the contaminant tanks decreasing over time. Third, treatments were circulated to the aquariums with a reduced flow through the 26-L tanks, which allowed a flow rate of 0.72 L/hr, to enhance the exposure of the organisms to the WSF of the oil. In this trial, the seawater storage sector was not used, since dilution was not applied and seawater from the treatment tanks was enough to perform all the trial. This second experiment was run for 21 days, with 7 days for acclimating the corals in the mesocosm and 14 days for the experiment. The parameters were measured four times during the experiment, including the acclimation period.

2.3.3 | Collecting corals in the field

Millepora alcornis colonies were collected for use in the experimental mesocosms from João Fernandes Beach, Armação dos Búzios (22°44'29.95"S; 41°52'35.62"W). During transportation, the nubbins were kept submerged in continuously renewed seawater under shade cloth with a capacity to block 70% of solar incidence and at the same water temperature as the collection site. *M. alcornis* was chosen for this study because it is one of the most abundant coral species at Armação dos Búzios.

At the PROCORAIS mesocosm, the colonies of *M. alcornis* were fragmented into pieces approximately 5 cm long. The coral was handled only by the tips to avoid obstructing and possibly damaging the polyps. The 5-cm nubbins were placed in each experimental aquarium (1.2 L).

2.3.4 | Physical and chemical validation

Temperature, salinity, and pH validation

Temperature, salinity, and pH were measured during both trials of the PROCORAIS Mesocosm with a multiparameter probe (model HI 9828; Hanna® Instruments, Tamboré, Barueri, São Paulo). We recorded these parameters every 2 days in the beginning of the experiment and every 3 days in trial 1 (eight measurements in total). In trial 2, we recorded these parameters four times (Days 0, 1, 4, and 13). In both experiments, we included the acclimation period (i.e., Day 0).

Analysis of nitrogen compounds

Seawater samples were collected from aquariums and filtered on cellulose membranes (0.45- μ m pore size and 47 mm diameter) for analyses of nitrogen compounds (nitrite, nitrate, and ammonium) in both trials. These samples were stored in amber bottles at -20°C, and

the analyses were performed by the Laboratory of Environmental Analyses, Institute of Biology, UFRJ, through the FIAstar® 5,000—Application Note: 5,200 for nitrite, 5,202 for nitrate, and 5,220 for ammonium (Foss Analytical, Höganäs, Sweden) by flow injection process.

Dissolved organic carbon analysis

Dissolved organic carbon (DOC) was evaluated in both trials. Aquarium seawater samples were collected (60 mL) from each aquarium and filtered in 0.45- μm pore size cellulose membranes. The membranes were stored in glass vials with Teflon caps with an addition of 50 μL phosphoric acid. The vials were stored at room temperature.

Samples were analyzed by the Multiuser Unit of Environmental Analysis, Institute of Biology, UFRJ, through the process of oxidation with sodium persulfate in a titanium furnace under high temperature and pressure. A Sievers InnovOx Total Organic Carbon (TOC) Analyzer was used to perform the analyses.

Quantification of petroleum hydrocarbons

To analyze total petroleum hydrocarbons (TPH) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) in both experiments, we collected 1 L of seawater from each replicate treatment aquarium (oil and control, four replicates each) in sterile amber glass bottles with Teflon caps. In trial 1, samples were taken at day 2 of experiment (36 hr after the oil was added in the contaminant tanks) day 5 and day 21 of experiment. In trial 2, samples were taken at day 2 of the experiment (36 hr after the oil was added in the mesocosm system), as well as days 4 and 14 of the experiment. All samples were stored at 4°C until analysis at about 24 hr after collection.

Hydrocarbons were extracted according to method 3510C (U.S. EPA, 1996). TPH analyses were performed using the gas chromatography technique with flame ionization detection (GC/FID) according to method 8015B (U.S. EPA, 2003). The 37 PAHs were detected by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS) using the 8270D method (U.S. EPA, 2007).

2.3.5 | Biological validation – Maximum photosynthetic capacity of photosystem II (F_v/F_m)

The efficacy of the mesocosm to detect biological effects of oil spills on corals was evaluated by comparing values of maximum photosynthetic quantum yield (F_v/F_m) among treatments and controls. F_v/F_m serves as an estimate of the associated-photosynthetic algae health and can directly infer the physiological state of corals in the treatments. The maximum quantum yield of photosystem II was determined from the fluorescence values, termed F_o and F_m . While basal or minimal fluorescence (F_o) corresponds to the signal emitted under nonactinic modulated illumination ($\sim 1.5 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), maximum fluorescence (F_m) was obtained by exposure to a pulse of saturating light ($6,000 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) in the presence of modulated light. The difference between these extreme values corresponds to the variable fluorescence value (F_v) and the F_v/F_m

ratio represents the maximum quantum efficiency of photosystem II. Measurements of F_v/F_m were taken at the same time and frequency as the physical and chemical parameters with a subaquatic pulse and amplitude-modulated fluorometer (Diving-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany) with the following configuration: measuring light intensity (MI) = 6; saturation pulse intensity (SI) = 8; saturation pulse width (SW) = 0.8; gain (G) = 1; damping (D) = 1. To avoid interference from diurnal photo-inhibition artifacts, measurements were taken 1 hr after sunset to ensure full recovery of the reaction centers. The intensity of the photosynthetically active radiation in each aquarium was measured using a Fiber Quantum Sensor (1 mm diameter) connected to the Diving-PAM. We positioned the probe on the tissue of coral polyps, using one randomly selected polyp per aquarium, and the same coral nubbin (from each replicate, $n = 4$ nubbins) was used to measure chlorophyll fluorescence at different sampling times. The hydrocorals were acclimated in the dark for 20 min, as this dark period results in the disappearance of the non-photochemical processes from the dissipation of the photosystem II excitation energy.

2.3.6 | Statistical analysis

Statistical comparisons of the repeated measurements were performed with the nlme package (Pinheiro, Bates, DebRoy, & Sarkar, 2017) in the R statistical software (R Core Team, 2017). For this analysis, we used the lme function (Pinheiro et al., 2017) to create a mixed effects model with Day and Treatment (control or oil) as interactive fixed effects and aquarium identity as a random effect. We then conducted a post hoc analysis to estimate the least square means and to identify statistically significant ($p < 0.05$) pairwise interactions between Day and Treatment (lsmeans package; Lenth, 2016) with Tukey tests. We log-transformed the physio-chemical measurements as needed to meet the assumptions of normality and homoscedasticity of model residuals.

3 | RESULTS

3.1 | Mesocosm validation

3.1.1 | Chemical and physical parameters

pH, temperature, and salinity

In trial 1, (Figure 5a) a significant difference of pH values was observed throughout time ($p < 0.0001$). In the both trials, the pH measurements increased at the same time. A significant difference in pH values was also observed between treatments ($p = 0.045$) for trial 2, but not over time (Figure 5b). Temperature was controlled by a water bath and monitored throughout the experiments and remained stable at 24°C in all aquariums, and no statistical differences were detected among treatments or across time. In both trials 1 and 2, salinity did not differ significantly between the treatments ($p > 0.05$; Figure 6a,b), but both trials were significantly different over time ($p < 0.001$ for trial 1 and $p < 0.003$ for trial 2), with an increase in

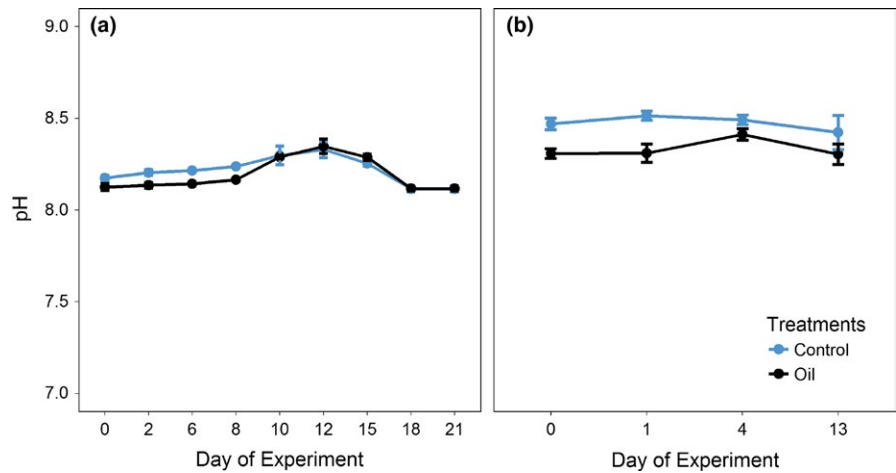


FIGURE 5 Measurements of pH during trial 1 (a) (21 days) and trial 2 (b) (14 days) in the treatments: CTRL (Control) and O (Oil)

salinity on the last days of each experiment compared with the first day.

Analysis of nitrogen compounds

Nitrate, ammonium, and nitrite measurements were below the detection limit in the first trial (6.8 $\mu\text{g/L}$, 5.9 $\mu\text{g/L}$, and 1.0 $\mu\text{g/L}$, respectively). In the second trial, nitrate levels did not differ significantly between treatments throughout time. Mean values of $58 \pm 10 \mu\text{g/L}$ and $43 \pm 20 \mu\text{g/L}$ were observed in the control and oil treatments, respectively. The nitrite levels were below the detection limit (0.9 $\mu\text{g/L}$). Ammonium levels did not differ as a function of the treatments ($p = 0.39$), but did differ over time ($p = 0.01$), with higher levels on day 4 compared with the first day.

DOC

In trial 1, DOC levels remained below the detection limit (0.004 mg/L) for all samples, while no difference ($p = 0.413$) was observed during trial 2 in DOC levels between treatments throughout time.

Detection of petroleum hydrocarbons

In the first trial, where oil contamination of 0.07% (v/v) was simulated, TPH and PAH fractions were below the detection limit (0.03 $\mu\text{g/L}$) in all treatments throughout the experiment. In the second trial, where a 1% (v/v) oil contamination was applied, TPH values differed significantly between treatments throughout time ($p < 0.001$). Least-squared means showed that TPH in the oil treatment at day 13 was significantly higher when compared to oil treatment at day 2 and 4 (both with $p < 0.001$) and control at day 13 ($p = 0.0070$). Mean TPH throughout the experiment was $21.75 \pm 14.90 \mu\text{g/L}$ for control and $67.41 \pm 29.26 \mu\text{g/L}$ for the oil-contaminated samples. PAH values of $0.90 \pm 0.35 \mu\text{g/L}$ and $2.08 \pm 0.5 \mu\text{g/L}$ were observed for control and oil-contaminated samples, respectively. In trial 2, PAH was significantly higher in the oil treatment on the second day of the experiment when compared with all other days and treatment combinations ($p = 0.01$). However, PAH levels stabilized in the oil treatment by day 4 and were not different from other day-treatment combinations throughout the remainder of the experiment.

Maximum photosynthetic capacity of photosystem II (F_v/F_m)

For both trials, F_v/F_m values of the *M. alcinornis* symbiotic algae ranged between 0.55 and 0.65 during the acclimatization period; F_v/F_m above 0.5 indicates that the corals were well adapted to the mesocosm (Fitt, Brown, Warner, & Dunne, 2001). In trial 1, no significant differences were observed in F_v/F_m values between treatments. The mean values (0.566 ± 0.05 for the control and 0.567 ± 0.006 for the oil) were similar between replicates (Figure 7a) and overtime ($p < 0.05$). These results suggest that the photosynthetic potential of the associated symbiotic algae was not negatively affected by oil, due to its low concentration (0.07%), as well as the high degree of weathering, low solubility, and availability in the water. In the second trial, the F_v/F_m values obtained from oil-contaminated aquariums decreased significantly from the day 4 (with a mean of 0.603 ± 0.009) until the end of the experiment (0.414 ± 0.106 ; Figure 7b).

4 | DISCUSSION

The PROCORAIS Mesocosm was designed to perform experiments on better understanding the effects of oil spills on corals, with a large set of true replicates and treatments. The mesocosm was designed principally to be used as a continuous-flow open system, and the materials chosen for its construction were carefully selected to not interact with the oil. This mesocosm can be easily adapted to test other environmental conditions, other contaminants, or with different marine organisms. In addition, the magnitude of contaminants is adjustable to test a range of scenarios. For example, the oil concentrations used in the validation experiments (0.07% and 1%) were chosen to simulate both low- and high-magnitude oil spills, respectively. The application of 1% oil concentration was especially important to test the ability of the system to deal with this contamination level that can be determinant for the magnitude of a spill impact on coral reefs—that is, the system dealt with high concentrations of oil without clogging, being able to emulate a high-magnitude spill, which is important to study the potential effects of a worst-case scenario. Furthermore, the hydrocorals were held in isolated tanks, avoiding any exchange

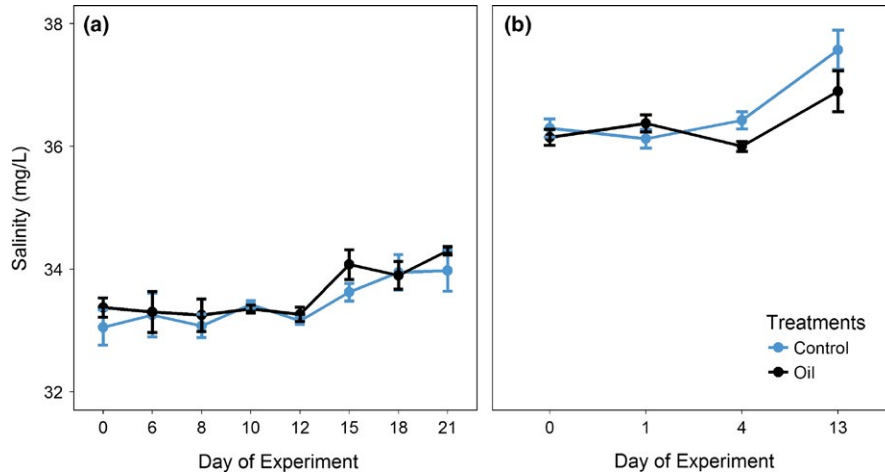


FIGURE 6 Measurements of salinity during trial 1 (a) (21 days) and trial 2 (b) (14 days) in the treatments: CTRL (Control) and O (Oil)

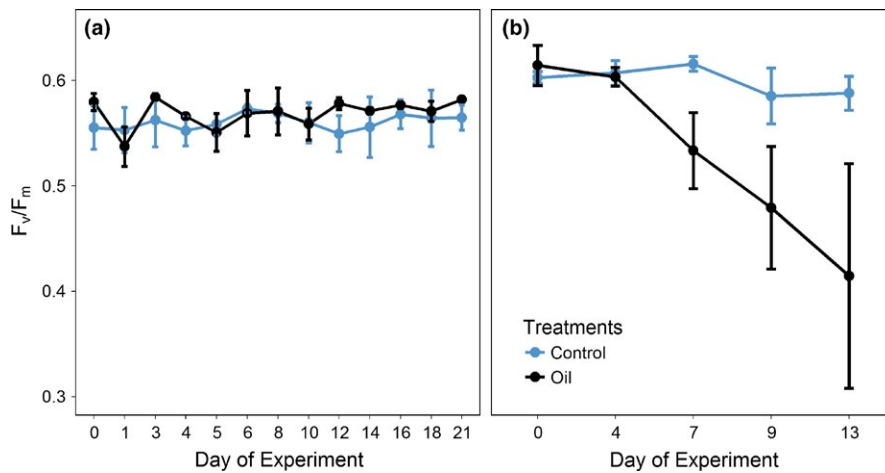


FIGURE 7 Measurements of photosynthetic quantum yield (F_v/F_m) of the algae associated with the hydrocoral *Millepora alcicornis* during trial 1 (a) (21 days) and trial 2 (b) (14 days) in the treatments: Ctrl (Control) and O (Oil)

of microbiota, mucus, and/or products of coral metabolism among replicates or distinct treatments. The design minimizes the possibility of the spread of coral diseases, mortality among replicates, and misleading results from a lack of true replication. The results obtained from the two validation experiments conducted here indicated that the system was successfully designed, and the biotic and abiotic conditions were reproducible between our independent replicates.

Turner and Renegar (2017) suggested that oil spills near coral reefs are the only opportunities to assess the effects of acute oil contamination on corals in situ. To the best of our knowledge, no open-contained system has been constructed for studies on the effect of oil spills and chemical strategies used for remediation described in the literature. Most studies are performed in closed-system microcosms due to operational and logistical difficulties. However, closed systems do not incorporate actual environmental factors to allow for reliable predictions of field situations (Reilly, 1999). According to Evans et al. (2010), approaches that integrate different methods on a larger scale could approximate these realistic levels. The use of mesocosm systems allows more precise modeling of several scenarios, in this case the exposure of coral to petroleum compounds and their impact on coral.

When possible, open systems are the best options for marine studies because they emulate a flow of nutrients that is closer to

natural levels. Open systems also avoid the accumulation of metabolic products from the organisms under study. Mucus secreted by corals during the day can cover up to 95% of the surface of some coral species (Bessell-Browne, Fisher, Duckworth, & Jones, 2017) and reach the equivalent of 30%–40% of their photosynthetic production (Crossland, Barnes, & Borowitzka, 1980) due to the high concentration of polysaccharides, lipids, and monosaccharides in coral mucus (Ducklow & Mitchell, 1979; Mitchell & Chet, 1975). Glasl, Herndl, and Frade (2016) showed that the mucus-associated prokaryotic community, which is influenced by natural mucus shedding, affects coral health. Thus, when using either open or closed systems, it is important to have a low water residence time in aquariums to maintain realistic experimental conditions (Schindler, 1998), which could be affected by the increase of DOC from excess mucus. Some authors have observed that an increase in DOC can indirectly influence corals by causing side effects ranging from tissue recession to death (Haas et al., 2010; Kuntz, Kline, Sandin, & Rohwer, 2005). The higher DOC content in highly contaminated samples may be due to the possible increase of mucus production by stressed corals. DOC is rich in carbon sources, acting as a culture medium for heterotrophic microbes (Brown & Bythell, 2005). The increase of this heterotrophic community can lead to hypoxia and the death of coral (Smith et al., 2006). According to Meyer et al. (2016), this problem

may also cause shifts in the microbial communities associated with corals and may reduce the rates of calcification and photosynthesis. The low DOC concentrations detected in the control samples in trials 1 and 2 suggest that the PROCORAIS mesocosm dealt effectively with the accumulation of mucus.

For studies of oil spills on coral reefs, a flow-through system is more realistic than static exposure in a closed system, which is another advantage of the PROCORAIS Mesocosm. Cohen, Nissenbaum, and Eisler (1977) observed that mortality of corals occurred in oil-exposure experiments with static exposure but that no mortality was observed in a flow-through experiment. The faster mortality of corals in closed systems can be explained by the damage caused by the contaminant impact combined with the increase of other harmful compounds, such as DOC, that may not reflect realistic rates observed in nature (Haas et al., 2010).

The use of gravity to feed the mesocosm was a major advantage of this system and provided several important benefits, including reduced maintenance and risk due to pump failure. Among the major constraints for the dilution of chemical contaminants (e.g., oil) in mesocosm studies is the use of peristaltic pumps. Chemical contaminants may corrode or clog hoses and thus interfere with the functionality of the mesocosm. In addition, the electrical energy consumption of peristaltic pumps is high and not considered a sustainable practice. For this reason, the PROCORAIS Mesocosm was developed to use gravity rather than peristaltic pumps. The design used gravity-fed flow that makes it unlikely to suffer equipment failures and was resistant to clogging that could lessen the reliability of results. Finally, the use of gravity feed from the 300-L tanks provided a buffer during which the mesocosm could continue to function several hours in the case of pump failure.

In addition to being flexible and adjustable to numerous experimental configurations, this system can be used to study the effects of other chemical agents or climate change on marine organisms, as well as the efficacy of remediation approaches, such as marine probiotics. The present experimental results suggest that the mesocosm met the requirements of realism, adaptability, and number of replications needed for this type of experiment. As an example, Rosado et al. (2018) successfully performed an experiment in the PROCORAIS Mesocosm that was adapted to study corals stressed by increasing temperatures and challenged with the inoculation of the thermal-dependent pathogen *Vibrio coralliilyticus* BAA-450 on the coral *Pocillopora damicornis*. In this case, a beneficial microorganism consortium (BMC) for corals (Peixoto, Rosado, Leite, Rosado, & Bourne, 2017) was also tested against the pathogen challenge and thermal stress (Rosado et al., 2018). For this experiment, the flow system was closed in aquariums, with each aquarium having its own 26-L tank to form a circulating flow, to avoid contamination of the environment by the pathogen and BMC inoculation.

When designing the PROCORAIS Mesocosm, it was critical to use materials that would not introduce contaminants that might influence the experiments while also considering the cost of such materials. Initially, Teflon was thought to be suitable for this mesocosm, because it is chemically inert, resistant to corrosion, and capable of repelling water and other chemical solvents with a low coefficient of

friction (Rae & Brown, 2005; Renfrew & Lewis, 1946). However, we discovered that the use of Teflon would be cost-prohibitive for such a complex system. Therefore, we chose the use of polypropylene tanks as a chemically resistant and cheaper material, and polyethylene and silicone hoses, as they are inert and do not interact chemically with other compounds (Rossmann, 1956; Shit & Shah, 2013). According to Kline et al. (2006), the long-term use of plastic materials (petroleum derivatives) may alter the data of some chemicals in chronic contact in the presence of corrosion. These materials, when corroded, may also cause changes in the microorganisms associated with corals, leading to an imbalance of this symbiotic association, due to the formation of biofilm in these materials. However, due to the short-term nature of our experiments, materials made of silicone, polyethylene, and polypropylene were effective in both trials, with no problems of corrosion, clogging, or risk of contamination.

The analyses performed to validate the PROCORAIS Mesocosm found the physical and chemical parameters to be generally stable and demonstrated the ability of the mesocosm to control environmental conditions, even among several experimental treatments. The salinity range was similar between treatments in the first trial and within the natural salinity range in seawater (33–35 g/L). In the second trial—when dilution was not adopted—mean salinity increased in all treatments. This behavior can be ascribed to the combined effects of evaporation and lack of seawater reposition, which lead to the higher salt concentration in the system. However, the salinity levels are near those at the beaches of Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, which average 33–35 g/L and reach 37 g/L in cold temperatures. pH was within the natural range observed at the coral collection site (pH = 8–9).

High-nutrient concentrations can have negative impacts on corals, including shifts from net accretion to net erosion of coral structures (Silbiger et al., 2018) and coral bleaching when coupled with thermal stress (Wang et al., 2018; Wiedenmann et al., 2013). The mesocosm maintained key water chemistry parameters (nitrite, nitrate, and ammonia) consistent throughout the experiment, with some exceptions during trial 2. However, increased ammonia concentrations over time in the closed system of trial 2 were consistent across treatments. Even with this increase in ammonia concentrations during trial 2, these values were still within the normal range of natural conditions according to the Brazilian CONAMA Resolution 357 (CONAMA, 2005; maximum value of nitrite = 200 µg/L and maximum values of nitrate and ammonia = 700 µg/L). These levels did not affect any other parameters, including coral health. The nutrient balance was maintained during the two trials, as were the temperature and DOC concentrations, which was important to avoid negative impacts due to high concentrations of these factors. The TPH and PAH values that were below detection limits in trial 1 were likely due to the oil concentration that was used (0.07%) and the fact that oil has very low solubility in water. In addition, the mesocosm setup with higher flow through likely caused an instantaneous dilution of the WSF. In contrast, the concentration of trial 2 (1%) emulates a worst-case, high-magnitude oil spill. According to an oil spill models developed by Applied Science Associates, Inc.

(ASA, 2003) with Marlim oil, 2% of spilled oil would be present in water column after 12–13 days (when oil would reach coastal waters) under a worst-case, high-magnitude spill scenario (305,443 m³ of spilled oil). In this case, hydrocarbon pseudoconcentration would start at 6,500 mg/L (0.65%) and decrease to 1,000 mg/L (0.1%) within 30 days. This example shows that the level of oil concentration adopted in trail 2 was still higher than those identified with this model. The model also predicted that the weathering processes and the poor solubility of Marlim oil in water would favor low contaminant concentrations in the water column; conditions reproduced by the PROCORAIS Mesocosm.

Critical to the purpose of the PROCORAIS Mesocosm, we were able to detect impacts oil contamination on coral health. Specifically, higher oil concentrations (1%) had a negative impact on the symbiotic photosynthetic algae of *M. alcicornis* (i.e., F_v/F_m) after day 4 of the experiment. These results agree with those of DeLeo et al. (2015), who showed a decline in coral physiology through short-term toxicological assays (0–96 hr) with a mixture of hydrocarbons. Additionally, in the PROCORAIS Mesocosm, when the concentration of oil in the tanks (“open ocean”) was increased by 14 times from the first to the second experiment, the WSFs of the oil were detectable in the “reefs” (aquariums).

In this study, we demonstrated the efficacy of the PROCORAIS Mesocosm to simulate oil spills of various magnitudes. This system presents several additional functionalities that are unique within the literature. First, the boxes holding the oil and water solution are exposed to realistic conditions of insolation and weathering. Thus, the mesocosm was able to simulate an oil spill and, very importantly, the time course of weathering until it reaches the reef. Second, we used natural sunlight with a light attenuating cloth that was able to mimic different depths in the reef while maintaining the characteristics of the light spectrum, which favors studies of PAM fluorimetry. Third, this system provides the ability to test various contaminants in combination with different temperatures to simulate the combined effects of climate change and anthropogenic stressors. Finally, a large part of the oil industry is located in developing countries where local universities do not have the financial resources to build expensive systems compared with developed countries. This system proved to be both effective and economical. Overall, this mesocosm system represents a unique structure and an opportunity to reproduce oil spills and their effects to coral reefs as realistically as possible, through the utilization of an open-flow system that simulates the oil's route from open-ocean areas to the reef, with true independent replicates. According to Sagarin et al. (2016), it is very difficult to obtain true replication in large-scale mesocosms and to combine replication with inferences from complex systems, partly because a large mesocosm is very laborious to maintain. The PROCORAIS Mesocosm allows up to 4 true replications per treatment for a total of 13 treatments, or more replicates of fewer treatments with options to run with open or closed experiments.

Control of the abiotic factors and the biotic responses based on the treatments applied is critical for mesocosm experiments

(Duarte et al., 2016; Richmond, 1993). The present study showed that the experiments performed with the PROCORAIS Mesocosm achieved this control even in different configurations. This flexibility is made possible by the use of the open- and closed-flow designs and the use of materials that are nonreactive with a range of chemical additives for experiments. Although the mesocosm system was developed in this case to study the effects of oil spills on coral reefs, it is clear that it could help other researchers to develop their own mesocosms and improve upon it from our findings and insights.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Luiz Fernando Martins (CENPES/Petrobras) and Dr. Ryan Hill for their critical reviews of this manuscript. We thank the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ), Brazil, for financial support. This work is part of the PROCORAIS Project sponsored by CENPES/PETROBRAS, agreement number 0050.0090605.14.9, regulated by ANP, the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP Resolution 05/2015).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no competing financial interests.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Duarte, G.; Rosado, A.S.; Soriano, A.; and Peixoto, R.S. involved in mesocosm conception and design; Duarte, G.; Villela, H.; Silva, D.; Rosado, A.S.; Soriano, A.; and Peixoto, R.S. involved in experimental design; Duarte, G.; Silva, D.; Rosado, P.; Ferreira, E.; Santos, H.; Villela, H.; and Peixoto, R.S. involved in mesocosm setup and adjustments; Silva, D.; Villela, H.; Rosado, P., Duarte, G., Soriano, A.; Rosado, J.G.; Santos, H.; and Peixoto, R.S. involved in acquisition of data (conducting of the experiments). Silva, D.; Duarte, G.; Villela, H.; Soriano, A.; and Peixoto, R.S. involved in analyses and interpretation of the data. Silva, D.; Duarte, G.; and Peixoto, R.S. drafted the manuscript. All authors involved in critical revision. Peixoto, R.S. provided financial support.

DATA ACCESSIBILITY

Data supporting this manuscript will be made available on ResearchGate following acceptance.

ORCID

Denise P. Silva  <https://orcid.org/0000-0002-9620-394X>

Alexandre S. Rosado  <https://orcid.org/0000-0001-5135-1394>

Raquel S. Peixoto  <https://orcid.org/0000-0002-9536-3132>

REFERENCES

- ABNT (Brazilian Association of Technical Standards) 14605-2 NBR (Brazilian Standards). (2010). *Storage of flammable and combustible liquids - Oil-water drainage system Part 2: Service station project, installation and maintenance, Brazil*. Retrieved from: <https://www.abntcatologo.com.br/norma>. Accessed 02 July 2017.
- Adams, M. (2003). *Developing an international oil spill policy strategy for the U.S. International Oil Spill Conference Proceedings, 2003*. 13–917.
- Ainsworth, T. D., Thurber, R. V., & Gates, R. D. (2010). The future of coral reefs: A microbial perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, 25, 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.11.001>
- Alexander, A. C., Luiker, E., Finley, M., & Culp, J. M. (2016). Chapter 8 - Mesocosm and Field Toxicity Testing in the Marine Context. In J. Blasco, P. M. Chapman, O. Campana, & M. Hampel (Eds.), *Marine Ecotoxicology*, (pp. 239–256). London, UK: Academic Press.
- ASA South America. (2003). *Study of Modeling of Accidents with Oil in the Campos Basin, FPSO P-47 - Technical Report* (in Portuguese).
- Bessell-Browne, P., Fisher, R., Duckworth, A., & Jones, R. (2017). Mucous sheet production in *Porites*: An effective bioindicator of sediment related pressures. *Ecological Indicators*, 77, 276–285. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.02.023>
- Brown, B. E., & Bythell, J. C. (2005). Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Marine Ecology Progress Series*, 296, 291–309. <https://doi.org/10.3354/meps296291>
- Cohen, Y., Nissenbaum, A., & Eisler, R. (1977). Effects of Iranian crude oil on the Red Sea octocoral *Heteroxenia fuscescens*. *Environmental Pollution*, 12, 173–186.
- CONAMA, Brazilian Ministry of Environment. (2005). *Classification of water bodies and environmental guidelines for their classification, as well as establishing the conditions and standards for the discharge of effluents, and other measures*. Resolution No. 357. (In Portuguese). Retrieved from: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Accessed 20 September 2017.
- CONAMA, Brazilian Ministry of Environment. (2011). *Conditions and standards for wastewater discharge*. Resolution No. 430. (In Portuguese). Retrieved from: <http://www.mma.gov.br/port/conama>. Accessed 20 September 2017.
- Crossland, C., Barnes, D., & Borowitzka, M. (1980). Diurnal lipid and mucus production in the staghorn coral *Acropora acuminata*. *Marine Biology*, 60, 81–90.
- Culp, J. M., & Baird, D. J. (2006). Establishing cause-effect relationships in multi-stressor environments. In: F. R. Hauer, & G. Lamberti (Eds.), *Methods in stream ecology* (2nd ed., pp. 835–854). Burlington, MA: Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-012332908-0.50050-4>.
- DeLeo, D. M., Ruiz-Ramos, D. V., Baums, I. B., & Cordes, E. E. (2015). Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep-Sea Research II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2015.02.028>
- Duarte, G., Calderon, E. N., Pereira, C. M., Marangoni, L. F. B., Santos, H. F., Peixoto, R. S., ... Castro, C. B. (2016). A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecology and Evolution*, 20, 4555–4566. <https://doi.org/10.1002/ece3.1670>
- Ducklow, H. W., & Mitchell, R. (1979). Observations on naturally and artificially diseased tropical corals: A scanning electron microscope study. *Microbial Ecology*, 5, 215–223.
- Epstein, N., Bak, R. P. M., & Rinkevich, R. B. (2000). Toxicity of third generation dispersants and dispersed Egyptian crude oil on Red Sea coral larvae. *Marine Pollution Bulletin*, 40, 497–503. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(99\)00232-5](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(99)00232-5)
- Evans, D. A., Newman, M. C., Lavine, M., Jaworska, J. S., Toll, J., Brooks, B. W., & Brock, T. C. M. (2010). *The Bayesian vantage for dealing with uncertainty. Application of uncertainty analysis to ecological risks of pesticides*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Fitt, W. K., Brown, B. E., Warner, M. E., & Dunne, R. P. (2001). Coral bleaching: Interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs*, 20, 51–65. <https://doi.org/10.1007/s003380100146>
- Glasl, B., Herndl, G., & Frade, P. R. (2016). The microbiome of coral surface mucus has a key role in mediating holobiont health and survival upon disturbance. *ISME Journal*, 10, 2280–2292.
- Guzmán, H. M., & Holst, I. (1993). Effects of chronic oil-sediment pollution on the reproduction of the Caribbean reef coral *Siderastrea siderea*. *Marine Pollution Bulletin*, 26, 276–282. [https://doi.org/10.1016/0025-326x\(93\)90068-u](https://doi.org/10.1016/0025-326x(93)90068-u).
- Guzmán, H. M., Jackson, J. B., & Weil, E. (1991). Short-term ecological consequences of a major oil spill on *Panamanian subtidal reef corals*. *Coral Reefs* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1007/bf00301900>
- Haas, A. F., Naumann, M. S., Struck, U., Mayr, C., el-Zibdah, M., & Wild, C. (2010). Organic matter release by coral reef associated benthic algae in the Northern Red Sea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 389, 53–60. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2010.03.018>
- Harrison, P. L., Collins, C. G., & Alexander, B. A. (1990). *The effects of fuel oil and dispersant on the tissues of a staghorn coral Acropora formosa: A pilot study*. In Scientific Input to Oil Spill Response, Proceedings of Second National Workshop on Role of Scientific Support Co-ordinator, HMAS Cerberus, Hastings, Victoria (pp. 51–61).
- Hsing, P. Y., Fu, B., Larcum, E. A., Berlet, S. P., Shank, T. M., Govindarajan, A. F., ... Fisher, C. R. (2013). Evidence of lasting impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep Gulf of Mexico coral community. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 1, 1–15. <https://doi.org/10.12952/journal.elementa.000012>.
- Hughes, T. P., Anderson, K. D., Connolly, S. R., Heron, S. F., Kerry, J. T., Lough, J. M., ... Wilson, S. K. (2018). Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science*, 359(6371), 80–83. <https://doi.org/10.1126/science.aan8048>
- Kline, D. I., Bryant, J., Kisflaudy, E., Rohwer, G., Nostropaur, F., Grayson, J., ... Rohwer, F. (2006). The aquatic automated dosing and maintenance system (AADAMS). *Limnology and Oceanography: Methods*, 4, 184–192. <https://doi.org/10.4319/lom.2006.4.184>
- Ko, F.-C., Chang, C.-W., & Cheng, J.-O. (2014). Comparative study of polycyclic aromatic hydrocarbons in coral tissues and the ambient sediments from Kenting National Park. *Taiwan. Environmental Pollution*, 185, 35–43. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.025>
- Kuntz, N. M., Kline, D. I., Sandin, S. A., & Rohwer, F. (2005). Pathologies and mortality rates caused by organic carbon and nutrient stressors in three Caribbean coral species. *Marine Ecology Progress Series*, 294, 173–180. <https://doi.org/10.3354/meps294173>
- Leite, D. C. A., Salles, J. F., Calderon, E. N., Castro, C. B., Bianchini, A., Marques, J. A., ... Peixoto, R. S. (2018). Coral bacterial-core abundance and network complexity as proxies for anthropogenic pollution. *Frontiers in Microbiology*, 9, 833. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00833>
- Lenth, R. V. (2016). Least-squares means: The R Package lsmeans. *Journal of Statistical Software*, 69(1), 1–33. <https://doi.org/10.18637/jss.v069.i01>
- Liu, P.-J., Meng, P.-J., Liu, L.-L., Wang, J.-T., & Leu, M.-Y. (1979). Abortion effect in corals induced by oil pollution. *Marine Ecology Progress Series* 1, 77–80. <https://doi.org/10.3354/meps001077>
- Liu, P. J., Meng, P. J., Liu, L. L., Wang, J. T., & Leu, M. Y. (2012). Impacts of human activities on coral reef ecosystems of southern Taiwan: A long-term study. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 1129–1135. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2012.03.031>
- Luckett, C., Adey, W. H., Morrissey, J., & Spoon, D. M. (1996). Coral reef mesocosms and microcosms—Successes, problems, and the future of laboratory models. *Ecological Engineering*, 6, 57–72. [https://doi.org/10.1016/0925-8574\(95\)00051-8](https://doi.org/10.1016/0925-8574(95)00051-8)

- Meyer, F. W., Vogel, N., Diele, K., Kunzmann, A., Uthicke, S., & Wild, C. (2016). Effects of high dissolved inorganic and organic carbon availability on the physiology of the hard coral *Acropora millepora* from the great barrier reef. *PLoS ONE* 11(3), e0149598. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149598>
- Mitchell, R., & Chet, I. (1975). Bacterial attack of corals in polluted seawater. *Microbiology Ecology*, 2, 227–233. <https://doi.org/10.1007/bf02010442>
- Muthukrishnan, R., & Fong, P. (2014). Multiple anthropogenic stressors exert complex, interactive effects on a coral reef community. *Coral Reefs*, 33, 911–921. <https://doi.org/10.1007/s00338-014-1199-1>
- Nepote, E., Bianchi, C. N., Chiantore, M., Morri, C., & Montefalcone, M. (2016). Pattern and intensity of human impact on coral reefs depend on depth along the reef profile and on the descriptor adopted. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 178, 86–91. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2016.05.021>
- NOAA (2010). *Oil spills in coral reefs: Planning and response considerations*. Retrieved from: https://response.restoration.noaa.gov/sites/default/files/Oil_Spill_Coral.pdf. Accessed 10 October 2017.
- Nyström, M., Folke, C., & Moberg, F. (2000). Coral reef disturbance and resilience in a human-dominated environment. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 413–417. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)01948-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)01948-0)
- Odum, E. P. (1984). The mesocosm. *BioScience*, 34, 558.
- Peixoto, R. S., Rosado, P., Leite, D. C. A., Rosado, A. S., & Bourne, D. (2017). Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 8, 341. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00341>
- Petersen, J. E., Cornwell, J. C., & Kemp, W. M. (1999). Implicit scaling in the design of experimental aquatic ecosystems. *Oikos*, 85(1), 3–18. <https://doi.org/10.2307/3546786>
- Pinheiro, J., Bates, D., DebRoy, S., Sarkar, D., & R Core Team. (2017) *nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models*. R package version 3.1-129. Retrieved from: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>
- Prouty, N. G., Fisher, C. R., Demopoulos, A. W. J., & Druffel, E. R. M. (2014). Growth rates and ages of deep-sea corals impacted by the Deepwater Horizon oil spill. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 129, 196–212. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2014.10.021>
- Putnam, H. M., Barott, K. L., Ainsworth, T. D., & Gates, R. D. (2017). The vulnerability and resilience of reef-building corals. *Current Biology*, 27(11), R528–R540. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.047>
- R Core Team. (2017). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from: <https://www.R-project.org/>. Accessed in 21th January 2019.
- Rae, P. J., & Brown, E. N. (2005). The properties of poly(tetrafluoroethylene) (PTFE) in tension. *Polymer*, 46, 8128–8140. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2005.06.120>
- Reichelt-Brushett, A. J., & Harrison, P. L. (1999). The effect of copper, zinc and cadmium on fertilization success of gametes from scleractinian reef corals. *Marine Pollution Bulletin*, 38, 182–187. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(98\)00183-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(98)00183-0)
- Reilly, T. (1999). The use of mesocosms in marine oil spill ecological research and development. *Pure and Applied Chemistry*, 71(1), 153–160. <https://doi.org/10.1351/pac199971010153>
- Renfrew, M. M., & Lewis, E. E. (1946). Polytetrafluoroethylene, heat-resistant, chemically inert plastic. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, 38, 870–877. <https://doi.org/10.1021/ie50441a009>
- Richmond, R. H. (1993). Coral reefs: Present problems and future concerns resulting from anthropogenic disturbance. *American Zoologist*, 33, 524–536. <https://doi.org/10.1093/icb/33.6.524>
- Richmond, R. H., Tisthammer, K. H., & Spies, N. P. (2018). The effects of anthropogenic stressors on reproduction and recruitment of corals and reef organisms. *Frontiers in Marine Science*, 5, 226. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00226>
- Riebesell, U., Fabry, V. J., Hansson, L., & Gattuso, J. P. (2010). *Guide to best practices for ocean acidification research and data reporting* (p. 260). Luxembourg: Publications Office of the European Union.
- Rosado, P. M., Leite, D. C. A., Duarte, G. A. S., Chaloub, R. M., Jospin, G., Nunes da Rocha, U., ... Peixoto, R. S. (2018). Marine probiotics: Increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *ISME Journal*, <https://doi.org/10.1038/s41396-018-0323-6>
- Rossmann, K. (1956). Improvement of bonding properties of polyethylene. *Journal of Polymer Science*, 19(91), 141–144. <https://doi.org/10.1002/pol.1956.120199114>
- Ruiz-Ramos, D. V., Fisher, C. R., & Baums, I. (2017). Stress response of the black coral *Leiopathes glaberrima* when exposed to sub-lethal amounts of crude oil and dispersant. *Elementa: Science of the Anthropocene*, 5, 77. <https://doi.org/10.1525/elementa.261>
- Sagarin, R. D., Adams, J., Blanchette, C. A., Brusca, R. C., Chorover, J., Cole, J. E., ... Troch, P. A. (2016). Between control and complexity: Opportunities and challenges for marine mesocosms. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 14(7), 389–396. <https://doi.org/10.1002/fee.1313>
- Santos, H. F., Duarte, G., Rachid, C. T., Chaloub, R., Calderon, E., Marangoni, L., ... Peixoto, R. S. (2015). Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Scientific Reports*, 5, 21868. <https://doi.org/10.1038/srep18268>
- Sävström, C., Hyndes, G. A., Eyre, B. D., Huggett, M. J., Fraser, M. W., Lavery, P. S., ... Laverock, B. (2016). Coastal connectivity and spatial subsidy from a microbial perspective. *Ecology and Evolution*, 6, 6662–6671. <https://doi.org/10.1002/ece3.2408>
- Schindler, D. W. (1998). Replication versus realism: The need for ecosystem-scale experiments. *Ecosystems*, 1, 323–334. <https://doi.org/10.1007/s100219900026>
- Shit, R. S. C., & Shah, P. (2013). A review on silicone rubber. *National Academy Science Letters*, 36(4), 355–365. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0150-2>
- Silbiger, N. J., Nelson, C. E., Remple, K., Sevilla, J. K., Quinlan, Z. A., Putnam, H. M., ... Donahue, M. J. (2018). Nutrient pollution disrupts key ecosystem functions on coral reefs. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 285(1880), 20172718. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.2718>
- Smith, J. E., Shaw, M., Edwards, R. A., Obura, D., Pantos, O., Sala, E., ... Rohwer, F. L. (2006). Indirect effects of algae on coral: Algae-mediated, microbe-induced coral mortality. *Ecology Letters*, 9(7), 835–845. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00937.x>
- Spalding, M., Burke, L., Wood, S. A., Spencer, A., Ashpole, J., Hutchison, J., & Ermgassene, F. Z. (2017). Mapping the global value and distribution of coral reef tourism. *Marine Policy*, 82, 104–113. <https://doi.org/10.1016/j.marpol.2017.05.01>
- Trimble, Inc. (2015). *SketchUp Pro: Release 16.0.19911*. Sunnyvale, CA: Trimble Inc.
- Turner, N. R., & Renegar, D. A. (2017). Petroleum hydrocarbon toxicity to corals: A review. *Marine Pollution Bulletin*, 119, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.04.050>
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (2003). *Method 8015D. Non-Halogenated Organics Using GC/FID, Revision 4*. Washington, DC. Retrieved from: https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/8015d_r4.pdf. Accessed 14 September 2017.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (2007). *Method 8270D. Semivolatile Organic Compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), Revision 4*. Washington, DC. Retrieved from: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-07/documents/epa-8270d.pdf>. Accessed 14 September 2017.
- United States Environmental Protection Agency (U.S. EPA). (1996). *Method 3510C. Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, Revision*

3. Washington, DC. Retrieved from: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-12/documents/3510c.pdf>. Accessed 14 September 2017.
- Wang, L., Shantz, A. A., Payet, J. P., Sharpton, T. J., Foster, A., Burkepile, D. E., & Vega Thurber, R. (2018). Corals and their microbiomes are differentially affected by exposure to elevated nutrients and a natural thermal anomaly. *Frontiers in Marine Science*, 5, 101. <https://doi.org/10.3389/fmars.2018.00101>.
- Wiedenmann, J., D'Angelo, C., Smith, E. G., Hunt, A. N., Legiret, F. E., Postle, A. D., & Achterberg, E. P. (2013). Nutrient enrichment can increase the susceptibility of reef corals to bleaching. *Nature Climate Change*, 3, 160–164. <https://doi.org/10.1038/nclimate1661>
- Xu, S., Yu, K., Wang, Y., Liu, T., Jiang, W., Wang, S., & Chu, M. (2018). Oil spill recorded by skeletal $\delta^{13}\text{C}$ of *Porites* corals in Weizhou Island, Beibu Gulf, Northern South China Sea. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 207, 338–344. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2018.04.031>

How to cite this article: Silva DP, Duarte G, Villela HDM, et al. Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals. *Ecol Evol*. 2019;9:5172–5185. <https://doi.org/10.1002/ece3.5095>

Artigo 2

A ser submetido à Revista **The Isme Journal**

5.2 Multi-domain probiotic consortium as an alternative to chemical remediation of oil spill in coral reefs in a changing world

Running Title: **Probiotic remediation of coral reef oil spills**

Denise P. da Silva.¹⁺, Helena D.M Villela.¹⁺, Henrique F. dos Santos³, Gustavo A. S. Duarte^{1,2}, José Roberto Ribeiro¹, Angela Michelato¹, Caren L.S. Vilela¹, Phillippe M. Rosado¹; Carolline S. Fazolato B.¹; Erika P. Santoro¹, Flavia L. Carmo¹ Dalton S. Ximenes⁴, Adriana U. Soriano⁴, Caio T. C.C. Rachid.⁵, Rebecca L. Vega Thurber^{6*}, Raquel S. Peixoto^{1, 2, 7*}

⁺Both authors contributed equally to this work

¹LEMM, Laboratory of Molecular Microbial Ecology, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

²IMAM-AquaRio – Rio de Janeiro Aquarium Research Center, Rio de Janeiro, Brazil

³Department of Marine Biology, Fluminense Federal University (UFF), Brazil

⁴Biotechnology Section, Leopoldo Américo Miguez de Mello Research Center, Petrobras, Rio de Janeiro, Brazil.

⁵LABEM, Institute of Microbiology Paulo de Góes, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brazil.

⁶ Department of Microbiology, Oregon State University, Oregon, USA.

⁷ Genome Center, University of California Davis, USA

*Corresponding authors

- Raquel Silva Peixoto

Phone: +55 2125626740; e-mail: raquelpeixoto@micro.ufrj.br

Address: Federal University of Rio de Janeiro, Av Carlos Chagas Filho, 373 CCS, BI E,

Rio de Janeiro, RJ, 21941902, Brazil;

- Rebecca Vega Thurber

Phone: +1 541-737-1851; e-mail: rebecca.vega-thurber@oregonstate.edu

Address: Nash Hall 226, OSU, Corvallis, OR 97331, USA.

Abstract

Oil spills and their associated remediation methods, such as chemical dispersants, have the potential to cause substantial harm to corals and reduce their resilience to global change stressors. To quantify the impact and find potential solutions, we conducted a mesocosm experiment with the fire coral *Millepora alcicornis* under a realistic oil spill scenario in which we applied an innovative multi-domain (bacteria, filamentous fungi, and yeast) probiotic bioremediation to assess effects on host health-associated microbiome. Here, we show, for the first time on calcifying cnidarians, that the exposure to Corexit® 9500c caused a significant change in the associated bacterial community, which was correlated with a negative impact on host physiology. Further, we identified a large number of phylogenetically related bioindicators of Corexit® 9500c presence. The negative effects of Corexit® 9500c are far greater than oil alone (killing corals after only 4 days of exposition in a flow-through system) and bioremediation with a mixed probiotic consortium helps mitigate impacts of oil contaminations on the coral, providing substantial improvements on n-alkanes, polycyclic aromatic hydrocarbon degradation, and coral health (Fv/Fm).

Keywords: Oil bioremediation, BMC, probiotics, chemical dispersant, Corexit® 9500c,

Millepora alcicornis.

Introduction

Coral reefs are especially sensitive to environmental changes [1]; a fact that is becoming apparent as reefs experience increasing numbers of global mass bleaching events [2]. Corals bleach when they expel the microalgae living inside their cells, without which, the host cannot maintain their minimal energy input and die if the conditions are not stabilized [3, 4]. Although climate change is attributed as the main reason for coral bleaching and the disappearance of modern reefs [2, 5, 6], other factors, such as reduced water quality [7–9], can also cause bleaching and damage coral cells [10, 11].

Oil spills occur worldwide in marine environments [12–14]. Yet, exposure to chronic oil contamination can impair biological functions in corals, including reproduction and recruitment [15]. Chemical dispersants, commonly used to treat oil spills, are more toxic to corals than oil itself [16–18]. Previous studies have reported substantial health declines in corals in response to short-term exposure (0–96h) to dispersants, and more severe impacts in response to the oil–dispersant mixtures (up to 4.4 fold), when compared with oil-only treatments [19]. Oil and dispersants may also disturb the symbioses between corals and a diversity of associated microorganisms (i.e, viruses, dinoflagellates, archaea, bacteria, and fungi) essential for host homeostasis [20–22]. Excepting microalgae, symbiotic interactions between corals and other microbial-associated groups are only starting to be revealed but studies suggest they play roles in nutrient cycling [23–25], antibiotic production [26], UV-damage protection [27] and the production of photosynthate in the skeleton [28] and coral tissues [29].

Some coral-associated microbial strains may be oil bioremediation-agents [30, 31]. For example, associated bacterial strains were manipulated to protect corals against oil impacts [31]. Based on the success of this work, a strategy for the manipulation of coral

microbes was later surveyed and proposed¹⁹ and the use of these “Beneficial Microorganisms for Corals” (BMCs) to increase general coral fitness was then validated [32]. This work opens several possibilities to mitigate impacts of oil contamination on corals but raises questions to be addressed, such as the efficacy of coral probiotics for different coral species and contaminants, and the use of microbes other than bacteria in bioremediation.

Our main objectives were to (1) develop an environmentally-friendly oil mitigation alternative to chemical dispersants – i.e. – bioremediation through a multi-domain consortium (putative BMC bioremediator consortium – pBMC-BC) composed of filamentous fungi, yeast and bacteria; (2) evaluate the effects of oil, dispersants, and pBMC-BC on corals; (3) investigate the associated bacteria in each treatment to evaluate their correlation with host health and (4) identify taxonomic indicators of each condition, increasing knowledge about potential targets for further surveys.

Methods

Ethics statement

Water and corals sampling licenses were obtained from the Municipal Secretary for Environment and Fisheries, Armação dos Búzios, RJ, Brazil (numbers 021/2016 and 014/2016, respectively). The microbial survey permit was obtained from CNPq (National Council for Scientific and Technological Development) and SISGEN number A620FE5.

Selection of an oil-degrading multi-domain microbial consortium

To isolate BMCs representative of the coral reefs from Armação dos Búzios,

seawater and coral fragments from the species *Millepora alcicornis* and *Siderastrea stellata* were collected at Ossos Beach, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil (22°44'45"S, 41°52'54"W), in September of 2014 and January of 2015. Coral fragments were placed in seawater from the sampling site and kept at 4°C until processed in the laboratory 4 hours later. Five g of each coral species were macerated in 45 mL of sterile saline solution (0.85% NaCl), and then shaken with glass beads overnight at 24°C with constant agitation of 180 rpm. Bacterial isolation was performed with 100 µL subsamples of dilutions from 10⁻⁶ up to 10⁻³ and seawater samples of dilutions of 10⁻⁹ up to 10⁻¹. In triplicate, we inoculated 4 different Bushnell-Haas (BH) agar media (Sigma - Aldrich, Missouri USA) which we then supplemented with oil water soluble and insoluble fractions (oWSF and oWIF, respectively), each at two salinities: 2.5% and 8% NaCl (details about the media preparation in supplementary methods). For fungi isolation, 400 mL of water was filtered in a 0.2 µm membrane and poured over a filter pad soaked with BH oWSF and oWIF broth (supplemented with glucose 0.1% and yeast extract 0.05%) in Petri dishes. An aliquot (0.2 ml) of coral macerate was spread on a plate with the 4 different BH agar media with 2% malt extract in triplicate. Plates were incubated at 25°C and observed within 3, 5, 7, 14, 21, and 28 days. A distinct morphotype in agar or filter was selected to a new plate of BH until purity was visually confirmed. The isolates were stored in glycerol (80%) at -80°C. Fungi isolates were tested to confirm they could use oil as their carbon source. Putative oil-degrading fungi strains were classified by colony morphology, color, and visual aspect after 5 days of growth. One representative of each different morphotype was selected for identification using DNA sequencing data.

Selected strains were submitted to genomic DNA extraction (Wizard Genomic DNA Purification kit; Promega, California, USA) followed by PCR amplification with primers 27f

and 1492r (bacteria) [33]; ITS1 and ITS4 [34] (filamentous fungi); ITS1 and NL4 [35] (yeast). Purified PCR products were quantified using a Qubit® 2.0 Fluorometer dsDNA-type fluorometer (Invitrogen, California, USA). Amplicons were sequenced (Macrogen Inc., Seoul, South Korea), with the primers 27f, 1492r, 532f, and 907r [36] for bacteria, ITS1 and ITS4 for filamentous fungi and ITS1, ITS4, NL1 [35] and NL4 for yeast strains. Sequences were processed with the Ribosomal Database Project II and further assembled into contigs with the program Bioedit 7.0.5.355 (details in supplementary methods). Contigs similarities were annotated using BLASTn and compared with the NCBI database. All sequences were deposited in GenBank under accession numbers shown in Table S2.

To evaluate the bacterial growth, we inoculated 1% of the 5 mL culture into flasks containing 100 mL of MB medium, in triplicate. The flasks were placed in an incubator under constant agitation (150 x g) at 26°C, and aliquots of 1 mL were taken each 6h for 48h. From each aliquot, two measurements were taken: 1) optical density (OD) estimation at 600 nm wavelength, 2) colony forming units (CFU) counted from serial dilutions (100 µL were plated in each plate and normalized to the volume of 1 mL). After, the OD-to-CFU correlation of each individual strain was used to calculate the number of cells based on the OD values.

Pairwise strains were inoculated cross-wise along the middle of plates containing MA agar media to test for antagonism. Plates were kept at 28 °C and monitored daily for up to 7 days for antagonistic activity. The steps we followed to select the oil-degrading consortium are outlined in Fig. 1A.

Oil-degrading consortium (pBMC-BC) preparation

For the pBMC-BC preparation, selected strains were individually grown in 3 L of medium of MB for bacteria, malt extract 2%, agar 2% with NaCl 2.5% (MS) for the filamentous fungi and MS broth for yeast in sterile 5 L bubble column bioreactors with a flow of 14 L.10⁻¹ h. The liquid growths were centrifuged and the cell pellet (or fungi propagule) was washed 3 times in sterile saline solution. The pellets of each individual culture were resuspended in saline solution and the OD was measured to estimate the number of bacterial cells. For fungi, the number of propagules was determined by dilution and count in a Neubauer chamber. Calculations were performed for each culture to reach a final concentration of 10⁷ cells mL⁻¹ for bacteria and 10⁴ cells mL⁻¹ for fungi. Finally, equal volume of each isolate culture was mixed in sterile 1 L flasks and aliquoted in 50 mL sterile tubes that were kept at 4°C until inoculation. The pBMC-BC preparation was always performed 2 days before inoculation to guarantee viability of cells.

Experimental design

The reef building *Millepora alcicornis* hydrocoral was selected for experimentation and four individual colonies, were collected in different sampling sites at João Fernandes Beach, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil [37] (details in Supplementary methods). The four colonies of *Millepora alcicornis* were fragmented into nubbins of approximately 5 cm in length, glued onto tiles, and placed in aquariums. To guarantee the validation of random effect, one coral nubbin from each one of the four colonies were placed in the same aquarium.

The experiment was conducted at the Center for the Study of Oil Bioremediation in Marine Environments, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil; (22°45'44.22"S; 41°53'3.97"W) in the Procorais mesocosm system [37]. The mesocosm was designed to

simulate marine environments and to assess the effects of accidental oil spills as well as remediation as described by Silva et al, 2019.

The primary experimental treatments were: 1) 'pBMC-BC'– consortium inoculation; 2) 'oWSF' (crude oil – 1% v/v within experimental aquaria); 3) 'Corexit® 9500c' (0.05% v/v according the Brazilian standard [38] and 4) all combinations of each as well as the Control (seawater). pBMC-BC was applied twice during the experiment (at days 1 and 7 of exposure), at the final concentration of 10^6 cells/mL (250 mL of 10^7 cells/mL in 250 L treatment tanks).

The experiment was conducted for a total of 28 days, including 5 days for *Millepora alcicornis* recovery after fragmentation with high seawater-flow (4-fold the aquariums volume), and 10 days for acclimatization at experimental conditions (0.5-fold the aquariums volume). Following the standard procedure of a fast spill response, we applied the two remediation approaches (Corexit® 9500c and pBMC-BC) 3h after spill initiation to simulate a real response team arriving at the affected site. For 24h, the remediation products acted on the oil in a closed system and, after this time, we reopened the system, simulating the time that the slick and the treatments would reach a reef nearby. Exposure to the treatments lasted 13 days, and a reinoculation of pBMC-BC was performed at day 7 of exposure. All samples were collected at days 1 (T0), 4 (T1) and 13 (T2) of exposure.

Physicochemical parameters

Salinity, pH, temperature, dissolved organic carbon (DOC), nitrogen compounds (nitrite, nitrate and ammonium), and phosphate were sampled, stored, and quantified as described in Silva et al. (2019). Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) was collected from 1 L of seawater from each replicate in sterile amber glass bottles with Teflon caps.

Samples were stored at 4°C until hydrocarbons were extracted after about 24h after sampling according to method 3510C [39]. PAH was detected by gas chromatography/mass spectrometry using method 8270D [40].

Coral health was evaluated as the maximum photosynthetic quantum yield (F_v/F_m) of the associated-photosynthetic algae. Samples were collected on days 1 (T0), 4 (T1), 7, 9 and 13 (T2) of exposure using a sub-aquatic pulse and amplitude-modulated fluorometer (Diving-PAM; Heinz Walz, Effeltrich, Germany; see Silva et al. 2019).

For each physicochemical parameter, including F_v/F_m , we developed mixed effects models (nlme package [41]; R statistical software [42]) with time and treatment as interactive fixed effects and aquarium identity as a random effect. We calculated least square means to identify statistically significant ($p < 0.05$) pairwise interactions between specific times and treatments (emmeans package [43]) with post hoc Tukey-tests.

Bacterial community associated with *Millepora alcicornis*

Methods for 16S rRNA gene extraction, amplicon sequencing, and bioinformatics are detailed in Supplementary methods. Briefly, the total DNA was extracted from 0.5 g of macerated coral nubbins from each aquarium. To sequence the V4 variable region of 16sRNA gene, single-step PCR amplification was performed with 515F and 806R [44] primers. The multiplexed libraries were sequenced on the Illumina MiSeq platform (Illumina, Inc., California, USA).

The raw data were analyzed using Mothur version.1.39.5. The paired-end sequences data were aligned, pre-clustered, and normalized. To improve the quality of the sequences the chimeras were removed. Sequences were taxonomically classified with the Ribosomal Database Project 16S rRNA version. The sequences were grouped in

Operative Taxonomic Units (OTUs) with dissimilarity of 3% threshold.

Measurements of α -diversity as Shannon and Chao indices were calculated using Mothur version.1.39.5 and analyzed in PAST using the ANOVA test. Three-way PERMANOVAs were performed to evaluate the differences in the structural composition between treatments (β -diversity analyses) with PRIMER-e version 7.

The OTU distribution together with the physicochemical data were used as input for Non-parametric Multidimensional Scaling (NMDS) using the Bray-Curtis similarity index to evaluate the relationships between the samples throughout the experiment. This statistical analysis was performed in the Paleontological Statistics Software (PAST) version 3.20.

To evaluate the impacts of oWSF, Corexit, and pBMC-BC on the relative abundance of the OTUs, we performed Indicator Species Analysis [45] was performed with the PC-ORD software version 6.0. This analysis determines an indicative value for each OTU from 0 (not indicative) to 100 (strong indicative). A value of 100 occurs when a particular OTU is present in high abundance in all samples of one treatment and at the same time is absent in all samples of the other treatment. A value equal to zero occurs when the distribution is equal regardless of the treatment. For this study, all OTUs with an indicator value above 60 and $p < 0.05$ were considered significant and these were subsequently used for the construction of a phylogenetic tree.

Results

Probiotic assemblage selection

A total of 57 bacteria were obtained from culture media containing oil-hydrocarbons. Isolates identified based on partial 16S rRNA gene sequencing as the

genus *Vibrio* or other potential opportunists to any organism were excluded due to their associations with disease and bleaching. The selected bacterial strains presented no antagonistic activity against each other. The members of bacterial consortium were identified as *Halomonas aquamarina*, *Pseudoalteromonas shioyasakiensis*, two *Cobetia marina* strains, *Shewanella* sp., and *Ochrobactrum anthropi*.

A total of 161 fungal (filamentous and yeasts) strains were isolated. Among them, 37 showed growth within 5 days of incubation in both fractions (oWSF and oWIF) and were clustered into 9 distinct morphotypes, which were then taxonomically identified and predicted to be of low risk to corals or other organisms based on literature reports. The selected fungal strains for the pBMC-BC assemblage were: *Geotrichum* sp., *Rhodotorula mucilaginosa*, and *Penicillium citrinum* (Table S1).

Exposure to different treatments alters coral holobiont physiology and pBMC-BC protect Millepora alcicornis against oil negative impacts

Millepora alcicornis holobiont health was investigated using maximum photosynthetic capacity of the associated Symbiodiniaceae (F_v/F_m) and changes in gross morphology (Fig 1B). At day 4 (T1) of exposure, corals exposed to dispersants were impacted. At T2, coral fragments within treatment containing Corexit® 9500c were dead and some fragments from oWSF became pale.

For corals not exposed to Corexit® 9500c (including controls), the least-squared means of F_v/F_m values ranged from 0.55 to 0.63 ± 0.03 (averages \pm Standard error) among treatments (Fig. 1C) throughout the experiment. The exception was the oWSF treatment without pBMC-BC that had a F_v/F_m mean that was 30% lower by T2 than those from the other non-Corexit® 9500c treatments. In addition, F_v/F_m decreased significantly in oWSF

samples from T0 to T2 ($p=0.01$), while the remaining treatments without dispersant, including oWSF + pBMC-BC, did not present significant decreases.

Treatments exposed to Corexit® 9500c – Corexit® 9500c, oWSF+Corexit® 9500c, pBMC-BC+Corexit® 9500c, and oWSF+pBMC-BC+Corexit® 9500c – showed F_v/F_m values lower than the Control ($p<0.0001$) throughout the experiment. By T2, loss of photosynthetic efficiency in dispersant treatments was 88-97% relative to the Control ($p<0.0001$). Considering treatments with Corexit® 9500c as one group and treatments without Corexit® 9500c as a second group, the former had F_v/F_m mean values lower than the latter at every sampling time: 12% in T0, 87% in T1, and 92% in T2. Corroborating the F_v/F_m results, gross morphological shifts were observed in dispersants treatments (Fig. 1B). At T1, corals exposed to dispersants were bleached and many presented tissues-sloughing necrosis by T2. Coral fragments exposed to oWSF were pale and negatively affected compared to the other non-dispersant treatments but exhibited less stress than fragments exposed to the dispersant (Fig S1).

Exposure to different treatments altered local physicochemical conditions

Throughout the experiment, temperature remained at 24°C in aquariums across all treatments. pH differed between treatments with Corexit® 9500c treatments having lower pH values than treatments without Corexit® 9500c ($p<0.001$, Fig S1). The DOC concentrations increased across all treatments during the experiment with T1 and T2 showing significantly higher DOC concentration ($p<0.0001$, Fig S1) than T0. Differences in salinity levels were significant throughout time ($p<0.0001$, Fig S1), showing an increase at T2. Ammonium and nitrate levels decreased at T2 in both treatments ($p <0.0001$ and $p = 0.0024$). Phosphate concentrations were higher at T2 when compared with T0 in all

treatments throughout time ($p < 0.001$, Fig S1) (Table 1).

Levels of PAHs increased significantly in treatments with oil and dispersants (both oWSF+Corexit® 9500c and oWSF+pBMC-BC+Corexit® 9500c). In treatments with oil but without dispersant (oWSF and oWSF+pBMC-BC), PAH levels at T2 were significantly lower in the treatments containing pBMC-BC than with oil only ($p=0.032$) when compared at T2, corroborating the consortium degradation efficiency. N-alkane levels were detectable only in oWSF+Corexit® 9500c and oWSF+pBMC-BC+Corexit® 9500c. The concentration of n-alkane in both treatments increased at T2 when compared to T0 ($p=0.013$). However, at time T2, N-alkanes in the treatments with pBMC-BC inoculation were 38% lower than in the treatment containing dispersant and oil only. The repeated measure ANOVA results and post hoc comparisons of the physicochemical conditions are in Table 1 and a summary of oil hydrocarbon that could be quantified are shown in Figure 2.

Exposure to different treatments alters coral microbiome

The 16S amplicon analysis assessed a total of 397,454 sequences that clustered into 5,986 OTUs (within the 3% dissimilarity threshold). The rarefaction curves in all samples reached an asymptote and indicated that high coverage sequencing was achieved (Fig S3).

Species diversity, represented by the Shannon index, did not differ significantly among the treatments throughout time (Fig S4). The Chao index showed decreased richness from T0 to T1 in all treatments, except the Corexit® 9500c that increased (Fig S5). However, the Chao index was lower in oWSF than in oWSF + pBMC-BC. β -diversity analyses indicated that Corexit® 9500c had a significant effect (three-way PERMANOVA

$p < 0.05$) on the structure of the bacterial community. In addition, microbial communities exposed to dispersant were significantly different (three-ways PERMANOVA $p < 0.05$) between T0 and T1 and between T0 and T2 (Pairwise three-ways PERMANOVA $p < 0.001$) (Tables S2 and S3).

Chemical dispersant impact on community structure was also corroborated with NMDS analysis that showed two distinct bacterial community clusters were formed throughout time: one in treatments with dispersant and another in non-dispersant treatments (Fig. 3). Taxonomic analysis identified 17 bacterial phyla and 27 classes associated with the *Millepora alcicornis* samples. The Proteobacteria phylum dominated all treatments (Fig S6). Alpha and Gammaproteobacteria were the dominant classes in all treatments in T0, but Alphaproteobacteria became more abundant than Gammaproteobacteria in Corexit® 9500c treatments (Fig S7).

Indicator species analysis showed that some OTUs were associated with pBMC-BC, oWSF, or dispersant with 95 significant OTUs identified ($p < 0.05$) (Fig. 5A). Among the three factors, the largest number of potential indicator bacteria were found in dispersant samples. For this reason, a phylogenetic tree was built to investigate evolutionary relationships among the bacterial OTUs that were bioindicators of the presence or the absence of the chemical dispersant. In Figure 5B, we can see a grouping based on 16S rRNA sequence similarity of dispersant presence indicators.

Discussion

Water pollution is listed as one of the three main causes of reefs losses globally [22]. Local management to minimize stressors can increase the ability of corals to cope with global impacts by reducing the synergistic effects caused by several stressors [46].

To this end, the United Nations recently highlighted the need to reduce marine pollution and protect and restore coral ecosystems in the “Global Goals for Sustainable Development” [47]. Recently, a committee by the National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine reviewed possible local and global interventions to increase the resilience of coral reefs [48]. Among such interventions, the manipulation of pBMCs [20] and the development of pollution remediation approaches were listed as possible strategies to help coral persistence.

Bioremediation methods present advantages when compared with other oil cleanup techniques, including sustainability, cost, and applicability across different ecosystems with minimal impacts [31, 49, 50]. The use of oil-degrading bacteria to remediate spills may have additional probiotic benefits through degradation of compounds. For instance, Santos et al. (2015) successfully minimized the toxicity of oil on the coral *Mussismilia harttii* with a bacterial probiotic consortium. However, the efficacy of bioremediation consortia presenting probiotic potential for protecting other coral against oil impacts are still unexplored, as well as the technologic possibility of including other players of the microbiome besides bacteria. In addition, the impact of chemical dispersants on calcifying hosts and their associated microbiome had not been tested before. Our results show that the combined use of bacteria, fungi and yeast associated with corals is possible and offers an alternative tool to the use of chemical dispersants, representing an environmentally friendly approach that decreases the oil concentration while potentially increasing coral resistance to stressors impacts.

Oil-degrading pBMC mitigated the negative physiological effects observed from the application of oWSF. Microbiome manipulation via application of a bacterial consortia to the coral holobiont have shown similar health benefits to corals in the presence of oil [31],

marine pathogens, and increased temperatures [32]. For instance, this study showed that application of the multi-domain probiotic consortium provided a significantly higher degradation of n-alkanes and PAHs. This degradation was associated with improved coral health metrics at the last sampling time of the experiment, compared to those samples without the probiotic inoculation. Therefore, this study provides strong evidence that the beneficial effects of the consortium are actual rather than putative, and we can now refer to our consortium as a “BMC-BC” consortium, rather than “putative”.

Corals were severely affected by Corexit® 9500c despite of the application of the beneficial consortium or the concomitant exposure to oil. Measurements of *Fv/Fm* revealed a separation in two groups: the ones containing dispersants and the ones without it. This data, together with the photo documentation – that corroborates the images of bleached/damaged tissue in the presence of Corexit® 9500c – show that dispersants damaged the animals shortly after its application in the experimental conditions (Fig 1C).

In addition, it was demonstrated for the first time the exposure to Corexit® 9500c caused a significant change in the associated bacteria community of calcifying cnidarians, which happened in parallel with a negative impact on host physiology. This new data on the effect of Corexit on the associated bacteria community of a marine calcifying organism, add to the list of known harmful effects of chemical dispersants on the physiology of divergent species from different ecosystems [19, 51, 52]. On corals, the damage goes from evident effects - such as bleaching and tissue necrosis [19, 53] - to subtle consequences - such as inhibition of fertilization and larvae metamorphosis [54], both influencing species perpetuation. Here, we corroborate these effects in a realistic, open-system experiment, and, also, disclose one more “invisible” impact that directly affect coral health: the effect of Corexit® 9500c on the associated microbiome.

Over 200 microbial genera have been reported as able to facultatively degrade petroleum hydrocarbons [55]. Here, the genera *Roseovarius*, and *Erythrobacter* increased in abundance in the presence of dispersant, were reported in the literature as capable of degrading petroleum hydrocarbons [56–59]. However, the presence of the dispersant also decreased the abundance of some other oil-degrading bacteria, such as *Thalassospira* and *Hyphomonas* [56, 60, 61] (Fig 4). This last genus, *Hyphomonas*, was also found as a potential bioindicator of the presence of oil (Fig 5A). Different oil degrading bacteria occurred in both the absence and presence of Corexit® 9500c, making it unclear whether, this dispersant is affecting the capacity of the microbial population to remediate oil in on a global scale. In previous studies, not only was the application of chemical dispersants ineffective to at promoting oil degradation, but it also caused a retardation in biodegradation [62].

Indeed, the presence of dispersants also promoted an increase in the number of bacteria that were found related to diseased and stressed corals. For instance, the genus *Ruegeria*, already reported as associated with diseased [63] and stressed [64] corals, increased in treatments containing dispersants. Additionally, members of the genus *Roseovarius* that are also associated with diseased [65–67] and stressed [64] corals increased in the presence of dispersant (Figs 4 and 5). Other bioindicators of the presence of dispersants include *Shimia*, *Thalassobius*, *Erythrobacter*, and *Desulfovibrio*, all found related to diseased and stressed corals [64, 67–70]. These results, altogether, may suggest that the disruption of beneficial interactions of the associated microbial community could be leading to a weakening of the host by the increase of commensal and opportunistic microbes or could happen as an immediate consequence of the dispersant exposure.

At the family level, an OTU closely related to Flavobacteriaceae, was one of the bioindicators of the presence of dispersant. Members of this family include well-known pathogenic species [71] and were reported having their abundance increased in diseased and impacted reefs [72, 73]. Although not classified as bioindicators, *Vibrio* OTUs have increased relative abundance along time samples in the presence of Corexit® 9500c, which can be explained by the fact that some *Vibrio* spp. can metabolize dispersants [74]. Besides, *Vibrio* species are known to have several members that are pathogens and opportunistic bacteria to many divergent groups of hosts, attaching humans, plants, corals, among others [75]. They have many lysogenic islands that can be horizontally transferred intra and inter specifically [76, 77], and their virulence can increase in stress conditions, such as temperature increase [78]. In corals, *Vibrio* species are known to be associated with several diseases [79–81]. Hamdan and Fulmer (2011), also observed an increase in members from the genus *Vibrio* after the exposure to Corexit® E9500c, being the most abundant isolates in the presence of the dispersant. These results suggest that chemical dispersants may not affect coral health only by its toxicity itself but also increase the abundance of pathogenic bacteria (i.e. bacteria of the genus *Vibrio*), that may promote dysbiosis and disease. In this context, the application of a multi-domain biodegrading consortium as an oil spill response technique can be an interesting alternative to the use of dispersants, since it could present two advantages: (1) filling the niche with probiotics that can avoid the colonization of coral reefs with pathogenic organisms and (2) contributing to the decrease of hydrocarbon concentrations and their potential impacts on corals.

Although most of the presence bioindicators have been already described as pathogens, a single dispersant-bioindicator was previously reported as presenting

potential beneficial characteristics, and identified as member of the genus *Labrenzia*, which was also already reported as being coral-associated and antimicrobial compounds producer [83]. A genome of a *Labrenzia* strain associated with coral revealed 71 genes related to antibiotics and toxic compounds resistance, 15 linked with cobalt-zinc-cadmium resistance and several genes encoding multidrug resistance efflux pumps. Moreover, it presented 4 halo acid dehalogenase encoding genes and one haloalkane dehalogenase encoding gene, that can be used to degrade a broad range of aromatic halogens, haloalcohols, and halo acids [84]. The identification of members of this genus as dispersant-bioindicators may represent a target for the further development of BMCs specifically selected to protect corals against Corexit® 9500c. Species of this genus are potential BMCs and oil-degrading bacteria concomitantly, which make them candidates for future experiments on petroleum contamination clean up close to coral reefs sites.

On the other hand, bacteria related to healthy corals were also found to be bioindicators of the absence of dispersants, meaning they were severely affected by its presence. For instance, the genus *Thalassospira* was found as a coral-associated bacterium related to healthy hosts [85], and potentially evolved with phosphorus cycle [86]. *Parvularcula* was also found related with healthy corals [87] as well as the genus *Inquilinus*, that was found playing an important role on heat-tolerance in corals [73]. The well-known coral symbiont *Endozoicomonas* was also negatively affected by the presence of chemical dispersants. Members of this genus have been frequently found associated with healthy corals [88–90], and the different strains genomes revealed functional adaptation and plasticity [91], suggesting that the relationship among this bacterial genus and the host is very important to the adaptation and survival of the holobiont.

The indicator OTUs phylogenetic grouping in the presence or absence of

dispersants (Figure 5B) strongly suggest that Corexit® 9500c is responsible for hindering or favoring metabolic capacities and/or morphological characteristics shared by some groups. For instance, related bacteria strains may share the ability of degrading Corexit® 9500c and are favored by its presence. By the other hand, morphological cell structures, such as the composition of the membranes and walls, could make some related groups more sensitive than others. To clarify this hypothesis, deeper investigations must be performed to reveal the exact mechanism of action of chemical dispersants on the affected coral related microbes.

This study addresses the impact of oil and Corexit® 9500c on coral physiology and microbiome, as well as the development of a bioremediation strategy that avoids the use of chemical dispersants in reef areas. As expected, oil impacted the coral health and physiology after the exposure. However, the multi-domain BMC-BC applied as a bioremediation treatment was able to protect the corals from the negative effects caused by the oil long-term exposure, by significantly increasing the degradation of oil and improving the host health, as measured by the F_v/F_m indirect healthy proxy and morphological traits. On the other hand, the presence of Corexit® 9500c impacted both host physiology and its microbiome shortly after application. The difference was so accentuated between groups with and without dispersant, that it probably masked some significant changes in coral microbiome under oil stress alone, once the statistical analysis was performed comparing all treatments. The NMDS presented in Figure 3, shows this inverse proportion between the presence of dispersant versus coral health.

The persistence of coral reefs depends on several changes that need to be achieved in a near future. The scientific community and environmental organizations must try to minimize the local and global impacts that affect reefs survival. This work examined

the coral microbiome response to chemical dispersant exposure, contributing for the further understanding of ecological interactions – such as symbiosis and pathogenicity – between the host and its associated microbes under adverse stress conditions. Indeed, innovative activities in environmentally friendly strategies to mitigate marine oil pollution without causing side effects, are insufficient [14] and must be stimulated, contributing to local actions to protect coral reefs in the Anthropocene.

Acknowledgments

We thank Luiz Fernando Martins (CENPES/Petrobras) and Ryan Hill for critical review of this manuscript. We also thank Ryan Hill for help with statistical analysis and Alexandre Rosado for thoughtful suggestions and discussions. We thank the Graduate Programs of Science (Microbiology) and Vegetal Biotechnology and Bioprocess Engineering (PBV)/ Federal University of Rio de Janeiro, the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), the National Council for the Improvement of Higher Education (CAPES), and the Carlos Chagas Filho Foundation for Research Support of Rio de Janeiro State (FAPERJ) for their support. This work is part of the PROCORAIS Project sponsored by CENPES/PETROBRAS, agreement number 0050.0090605.14.9, regulated by ANP, the Brazilian National Agency of Petroleum, Natural Gas and Biofuels (ANP Resolution 05/2015).

Conflict of interest

The authors declare no conflict financial interest.

Author contributions

Study conception and design: Peixoto, R.S.; A.S.; Soriano, A.; Duarte, G.; Silva, P.D.; Villela, H.D.M. Conducting experiments: Peixoto, R.S Silva, P.D.; Villela, H.D.M.; Duarte, G.; Santos, H.F.; Ribeiro, J.R.; Ghizelini, A.M.; Vilela, C.L.S.; Rosado, P.; Fazolato, C.S.B.; Santoro, E.P.; Carmo, F.L.; Ximenes, D. S.; Analyses and data interpretation; Peixoto, R.S.; Silva, P.D.; Villela, H.D.M.; Rachid, C.T.C.C.; Soriano. A.; Vega Thurber, R. Drafting of the manuscript: Peixoto, R.S.; Silva, P. D.; Villela, H.D.M. Vega Thurber, R. All authors involved in critical revision. Peixoto, R.S. provided financial support.

Supplementary information is available at The Isme journal's website

References

1. Braverman I. Coral Whisperers: Scientists on the Brink. 2018. Univ of California Press.
2. Hughes TP, Anderson KD, Connolly SR, Heron SF, Kerry JT, Lough JM, et al. Spatial and temporal patterns of mass bleaching of corals in the Anthropocene. *Science (80-)* 2018; **359**: 80 LP – 83.
3. Glynn PW. Coral reef bleaching: ecological perspectives. *Coral Reefs* 1993; **12**: 1–17.
4. Douglas AE. Coral bleaching—how and why? *Mar Pollut Bull* 2003; **46**: 385–392.
5. Pandolfi JM, Connolly SR, Marshall DJ, Cohen AL. Projecting Coral Reef Futures Under Global Warming and Ocean Acidification. *Science (80-)* 2011; **333**: 418 LP – 422.
6. Hughes TP, Kerry JT, Álvarez-Noriega M, Álvarez-Romero JG, Anderson KD,

- Baird AH, et al. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. *Nature* 2017; **543**: 373.
7. Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, et al. Coral Reefs Under Rapid Climate Change and Ocean Acidification. *Science (80-)* 2007; **318**: 1737 LP – 1742.
 8. Wooldridge SA. Water quality and coral bleaching thresholds: Formalising the linkage for the inshore reefs of the Great Barrier Reef, Australia. *Mar Pollut Bull* 2009; **58**: 745–751.
 9. Wang L, Shantz AA, Payet JP, Sharpton TJ, Foster A, Burkepile DE, et al. Corals and Their Microbiomes Are Differentially Affected by Exposure to Elevated Nutrients and a Natural Thermal Anomaly . *Front Mar Sci* . 2018. , **5**: 101
 10. Loya Y, Rinkevich B. Effects of oil pollution on coral reef communities. *Mar Ecol Prog Ser Prog Ser* 1980; **3**: 180.
 11. White HK, Hsing P-Y, Cho W, Shank TM, Cordes EE, Quattrini AM, et al. Impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. *Proc Natl Acad Sci* 2012; **109**: 20303 LP – 20308.
 12. Peterson CH, Rice SD, Short JW, Esler D, Bodkin JL, Ballachey BE, et al. Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. *Science (80-)* 2003; **302**: 2082 LP – 2086.
 13. Atlas RM, Hazen TC. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two Worst Spills in U.S. History. *Environ Sci Technol* 2011; **45**: 6709–6715.
 14. Villela HDM, Peixoto RS, Soriano AU, do Carmo FL. Microbial bioremediation of oil contaminated seawater: A survey of patent deposits and the characterization of the top genera applied. *Sci Total Environ* 2019.

15. Rinkevich B, Loya Y. The reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. I. Gonads and planulae. *Mar Ecol Prog Ser* 1979; 133–144.
16. Haapkylä J, Ramade F, Salvat B. Oil pollution on coral reefs: A review of the state of knowledge and management needs. *Vie et Milieu* . 2007.
17. Shafir S, Van Rijn J, Rinkevich B. Short and Long Term Toxicity of Crude Oil and Oil Dispersants to Two Representative Coral Species. *Environ Sci Technol* 2007; **41**: 5571–5574.
18. Branan N. Chemicals worse for corals than oil. *Geotimes* 2007; **52**: 8–9.
19. DeLeo DM, Ruiz-Ramos D V, Baums IB, Cordes EE. Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 2016; **129**: 137–147.
20. Peixoto R, Rosado PM, Leite DC de A, Rosado AS, Bourne DG. Beneficial Microorganisms for Corals (BMC): Proposed Mechanisms for Coral Health and Resilience. *Front Microbiol* 2017; **8**: 341.
21. Rohwer F, Seguritan, Azam, Knowlton N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* 2002; **243**: 1–10.
22. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* 2007; **5**: 355.
23. Kimes NE, Van Nostrand JD, Weil E, Zhou J, Morris PJ. Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. *Environ Microbiol* 2010; **12**: 541–556.
24. Wegley L, Edwards R, Rodriguez-Brito B, Liu H, Rohwer F. Metagenomic analysis

- of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* 2007; **9**: 2707–2719.
25. Raina J-B, Tapiolas D, Willis BL, Bourne DG. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl Environ Microbiol* 2009; **75**: 3492–3501.
 26. Ritchie KB. Bacterial symbionts of corals and Symbiodinium. *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms*. 2012. Springer, pp 139–150.
 27. Dunlap WC, Shick JM. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. *J Phycol* 1998; **34**: 418–430.
 28. Fine M, Loya Y. Endolithic algae: an alternative source of photoassimilates during coral bleaching. *Proceedings Biol Sci* 2002; **269**: 1205–1210.
 29. Janouškovec J, Horák A, Barott KL, Rohwer FL, Keeling PJ. Global analysis of plastid diversity reveals apicomplexan-related lineages in coral reefs. *Curr Biol* 2012; **22**: R518–R519.
 30. Zhang Y, Ling J, Yang Q, Wen C, Yan Q, Sun H, et al. The functional gene composition and metabolic potential of coral-associated microbial communities. *Sci Rep* 2015; **5**: 16191.
 31. Santos H, Duarte GAS, Rachid CT da C, Chaloub RM, Calderon EN, Marangoni LF de B, et al. Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Sci Rep* 2015; **5**: 18268.
 32. Rosado P, Leite DCA, Duarte GAS, Chaloub RM, Jospin G, Nunes da Rocha U, et al. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. *ISME J* 2019.

33. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. In 'Nucleic acid techniques in bacterial systematics'. (Eds E Stackebrandt, M Goodfellow) pp. 115–175. 1991. John Wiley and Sons: Chichester, UK.
34. White TJ, Bruns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. 1990. pp 315–322.
35. O'Donnell K. *Fusarium and its near relatives. Fusarium and its near relatives.* 1993. pp 225–233.
36. Lane DJ. 16S/23S rRNA sequencing. *Nucleic acid Tech Bact Syst* 1991; 115–175.
37. Silva D, Duarte G, Villela HDM, Santos HF, Rosado PM, Rosado JG, et al. Adaptable mesocosm facility to study oil spills impacts on corals. *Ecol Evol* 2019.
38. CONAMA. Conselho Nacional do Meio Ambiente 357/05. 2005. Brazil.
39. United States Environmental Protection Agency. Method 3510C. Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction, Revision 3. 1996. Washington, DC. , 8
40. United States Environmental Protection Agency. Method 8270D. Semivolatile Organic Compounds by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS), Revision 4. 2007. Washington, DC. , 62
41. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D, Heisterkamp S, Van Willigen B, et al. Package 'nlme'. *Linear Nonlinear Mix Eff Model version* 2017; 1–3.
42. Team RC. R: A language and environment for statistical computing (Version 3.4.2)[Computer software]. *Vienna, Austria R Found Stat Comput* 2017.
43. Lenth R, Lenth MR. Package 'lsmeans'. *Am Stat* 2018; **34**: 216–221.
44. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci* 2011; **108**: 4516 LP – 4522.

45. Dufrene M, Legendre P. Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. *Ecological monographs* . 1997.
46. Shaver EC, Burkepile DE, Silliman BR. Local management actions can increase coral resilience to thermally-induced bleaching. *Nat Ecol Evol* 2018; **2**: 1075–1079.
47. United Nations. A-68-970 Report of the Open Working Group of the General Assembly on Sustainable Development Goals. 2014.
48. National Academies of Sciences and Medicine E. A Research Review of Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs. 2019. The National Academies Press, Washington, DC.
49. do Carmo FL, dos Santos HF, Martins EF, van Elsas JD, Rosado AS, Peixoto RS. Bacterial structure and characterization of plant growth promoting and oil degrading bacteria from the rhizospheres of mangrove plants. *J Microbiol* 2011; **49**: 535–543.
50. Cury JC, Jurelevicius DA, Villela HDM, Jesus HE, Peixoto RS, Schaefer CEGR, et al. Microbial diversity and hydrocarbon depletion in low and high diesel-polluted soil samples from Keller Peninsula, South Shetland Islands. *Antarct Sci* 2015; **27**: 263–273.
51. Wise J, Wise JP. A review of the toxicity of chemical dispersants. *Rev Environ Health* 2011; **26**: 281–300.
52. Bretherton L, Kamalanathan M, Genzer J, Hillhouse J, Setta S, Liang Y, et al. Response of natural phytoplankton communities exposed to crude oil and chemical dispersants during a mesocosm experiment. *Aquat Toxicol* 2019; **206**: 43–53.

53. Studivan MS, Hatch WI, Mitchelmore CL. Responses of the soft coral *Xenia elongata* following acute exposure to a chemical dispersant. *Springerplus* 2015; **4**: 80.
54. Negri AP, Hoogenboom MO. Water contamination reduces the tolerance of coral larvae to thermal stress. *PLoS One* 2011; **6**: e19703.
55. Yakimov MM, Timmis KN, Golyshin PN. Obligate oil-degrading marine bacteria. *Curr Opin Biotechnol* 2007; **18**: 257–266.
56. Gallego S, Vila J, Tauler M, Nieto JM, Breugelmans P, Springael D, et al. Community structure and PAH ring-hydroxylating dioxygenase genes of a marine pyrene-degrading microbial consortium. *Biodegradation* 2014; **25**: 543–556.
57. Harwati TU, Kasai Y, Kodama Y, Susilaningsih D, Watanabe K. *Tropicibacter naphthalenivorans* gen. nov., sp. nov., a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium isolated from Semarang Port in Indonesia. *Int J Syst Evol Microbiol* 2009; **59**: 392–396.
58. Iwaki H, Nishimura A, Hasegawa Y. *Tropicibacter phthalicus* sp. nov., a phthalate-degrading bacterium from seawater. *Curr Microbiol* 2012; **64**: 392–396.
59. Zhuang L, Liu Y, Wang L, Wang W, Shao Z. *Erythrobacter atlanticus* sp. nov., a bacterium from ocean sediment able to degrade polycyclic aromatic hydrocarbons. *Int J Syst Evol Microbiol* 2015; **65**: 3714–3719.
60. Hara A, Sytsubo K, Harayama S. *Alcanivorax* which prevails in oil-contaminated seawater exhibits broad substrate specificity for alkane degradation. *Environ Microbiol* 2003; **5**: 746–753.
61. Li C, Lai Q, Li G, Liu Y, Sun F, Shao Z. Multilocus Sequence Analysis for the Assessment of Phylogenetic Diversity and Biogeography in *Hyphomonas* Bacteria

- from Diverse Marine Environments. *PLoS One* 2014; **9**: e101394.
62. Mulkins-Phillips GJ, Stewart JE. Effect of four dispersants on biodegradation and growth of bacteria on crude oil. *Appl Microbiol* 1974; **28**: 547–552.
63. Apprill A, Hugueny K, Mincer T. Major similarities in the bacterial communities associated with lesioned and healthy *Fungiidae* corals. *Environ Microbiol* 2013; **15**: 2063–2072.
64. Geffen Y, Ron EZ, Rosenberg E. Regulation of release of antibacterials from stressed scleractinian corals. *FEMS Microbiol Lett* 2009; **295**: 103–109.
65. Cooney RP, Pantos O, Tissier MDA Le, Barer MR, O'Donnell AG, Bythell JC. Characterization of the bacterial consortium associated with black band disease in coral using molecular microbiological techniques. *Environ Microbiol* 2002; **4**: 401–413.
66. Pantos O, Bythell JC. Bacterial community structure associated with white band disease in the elkhorn coral *Acropora palmata* determined using culture-independent 16S rRNA techniques. *Dis Aquat Organ* 2006.
67. Miller AW, Richardson LL. A meta-analysis of 16S rRNA gene clone libraries from the polymicrobial black band disease of corals. *FEMS Microbiol Ecol* 2011; **75**: 231–241.
68. Séré MG, Tortosa P, Chabanet P, Turquet J, Quod J-P, Schleyer MH. Bacterial communities associated with *Porites* white patch syndrome (PWPS) on three Western Indian Ocean (WIO) coral reefs. *PLoS One* 2013; **8**: e83746.
69. Pantos O, Cooney RP, Le Tissier MDA, Barer MR, O'Donnell AG, Bythell JC. The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. *Environ Microbiol* 2003; **5**: 370–382.

70. Viehman S, Mills DK, Meichel GW, Richardson LL. Culture and identification of *Desulfovibrio* spp. from corals infected by black band disease on Dominican and Florida Keys reefs. *Dis Aquat Organ* 2006; **69**: 119–127.
71. McBride MJ. The Family Flavobacteriaceae BT - The Prokaryotes: Other Major Lineages of Bacteria and The Archaea. In: Rosenberg E, DeLong EF, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (eds). 2014. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 643–676.
72. Sunagawa S, DeSantis TZ, Piceno YM, Brodie EL, DeSalvo MK, Voolstra CR, et al. Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *ISME J* 2009; **3**: 512–521.
73. Ziegler M, Roik A, Porter A, Zubier K, Mudarris MS, Ormond R, et al. Coral microbial community dynamics in response to anthropogenic impacts near a major city in the central Red Sea. *Mar Pollut Bull* 2016; **105**: 629–640.
74. Salter I, Zubkov M V, Warwick PE, Burkill PH. Marine bacterioplankton can increase evaporation and gas transfer by metabolizing insoluble surfactants from the air-seawater interface. *FEMS Microbiol Lett* . 2009. England. , **294**: 225–231
75. Le Roux F, Wegner KM, Baker-Austin C, Vezzulli L, Osorio CR, Amaro C, et al. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). *Front Microbiol* 2015; **6**: 830.
76. Jermyn WS, Boyd EF. Characterization of a novel *Vibrio* pathogenicity island (VPI-2) encoding neuraminidase (*nanH*) among toxigenic *Vibrio cholerae* isolates. *Microbiology* 2002; **148**: 3681–3693.
77. Boyd EF, Moyer KE, Shi L, Waldor MK. Infectious CTXPhi and the *vibrio* pathogenicity island prophage in *Vibrio mimicus*: evidence for recent horizontal

- transfer between *V. mimicus* and *V. cholerae*. *Infect Immun* 2000; **68**: 1507–1513.
78. Ben-Haim Y, Thompson FL, Thompson CC, Cnockaert MC, Hoste B, Swings J, et al. *Vibrio coralliilyticus* sp. nov., a temperature-dependent pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. *Int J Syst Evol Microbiol* 2003; **53**: 309–315.
79. Banin E, Ben-Haim Y, Israely T, Loya Y, Rosenberg E. Effect of the environment on the bacterial bleaching of corals. *Environmental Challenges*. 2000. Springer, pp 337–352.
80. Ben-Haim Y, Rosenberg E. A novel *Vibrio* sp. pathogen of the coral *Pocilloporadamicornis*. *Mar Biol* 2002; **141**: 47–55.
81. Rosenberg E, Ben-Haim Y. Microbial diseases of corals and global warming. *Environ Microbiol* 2002; **4**: 318–326.
82. Hamdan LJ, Fulmer PA. Effects of COREXIT® EC9500A on bacteria from a beach oiled by the Deepwater Horizon spill. *Aquat Microb Ecol* 2011; **63**: 101–109.
83. Chen Y-H, Kuo J, Sung P-J, Chang Y-C, Lu M-C, Wong T-Y, et al. Isolation of marine bacteria with antimicrobial activities from cultured and field-collected soft corals. *World J Microbiol Biotechnol* 2012; **28**: 3269–3279.
84. Rodrigues GN, Lago-Leston A, Costa R, Keller-Costa T. Draft Genome Sequence of *Labrenzia* sp. Strain EL143, a Coral-Associated Alphaproteobacterium with Versatile Symbiotic Living Capability and Strong Halogen Degradation Potential. *Genome Announc* 2018; **6**.
85. Rubio-Portillo E, Kersting DK, Linares C, Ramos-Esplá AA, Antón J. Biogeographic differences in the microbiome and pathobiome of the coral *Cladocora caespitosa* in the Western Mediterranean Sea. *Front Microbiol* 2018; **9**: 22.

86. Thomas S, Burdett H, Temperton B, Wick R, Snelling D, McGrath JW, et al. Evidence for phosphonate usage in the coral holobiont. *ISME J* 2010; **4**: 459.
87. Yu Z, Lai Q, Li G, Shao Z. *Parvularcula dongshanensis* sp. nov., isolated from soft coral. *Int J Syst Evol Microbiol* 2013; **63**: 2114–2117.
88. Speck MD, Donachie SP. Widespread Oceanospirillaceae Bacteria in *Porites* spp. . *J Mar Biol* 2012.
89. Bayer T, Neave MJ, Alsheikh-Hussain A, Aranda M, Yum LK, Mincer T, et al. The Microbiome of the Red Sea Coral *Stylophora pistillata*; Is Dominated by Tissue-Associated *Endozoicomonas endosymbionts*. *Appl Environ Microbiol* 2013; **79**: 4759 LP – 4762.
90. Neave MJ, Rachmawati R, Xun L, Michell CT, Bourne DG, Apprill A, et al. Differential specificity between closely related corals and abundant *Endozoicomonas endosymbionts* across global scales. *ISME J* 2017; **11**: 186–200.
91. Neave MJ, Michell CT, Apprill A, Voolstra CR. *Endozoicomonas* genomes reveal functional adaptation and plasticity in bacterial strains symbiotically associated with diverse marine hosts. *Sci Rep* 2017; **7**: 40579.
92. Badali H, Carvalho VO, Vicente V, Attili-Angelis D, Kwiatkowski IB, Gerrits Van Den Ende AHG, et al. *Cladophialophora saturnica* sp. nov., a new opportunistic species of Chaetothyriales revealed using molecular data. *Med Mycol* 2009; **47**: 51–62.

FIGURES LEGENDS

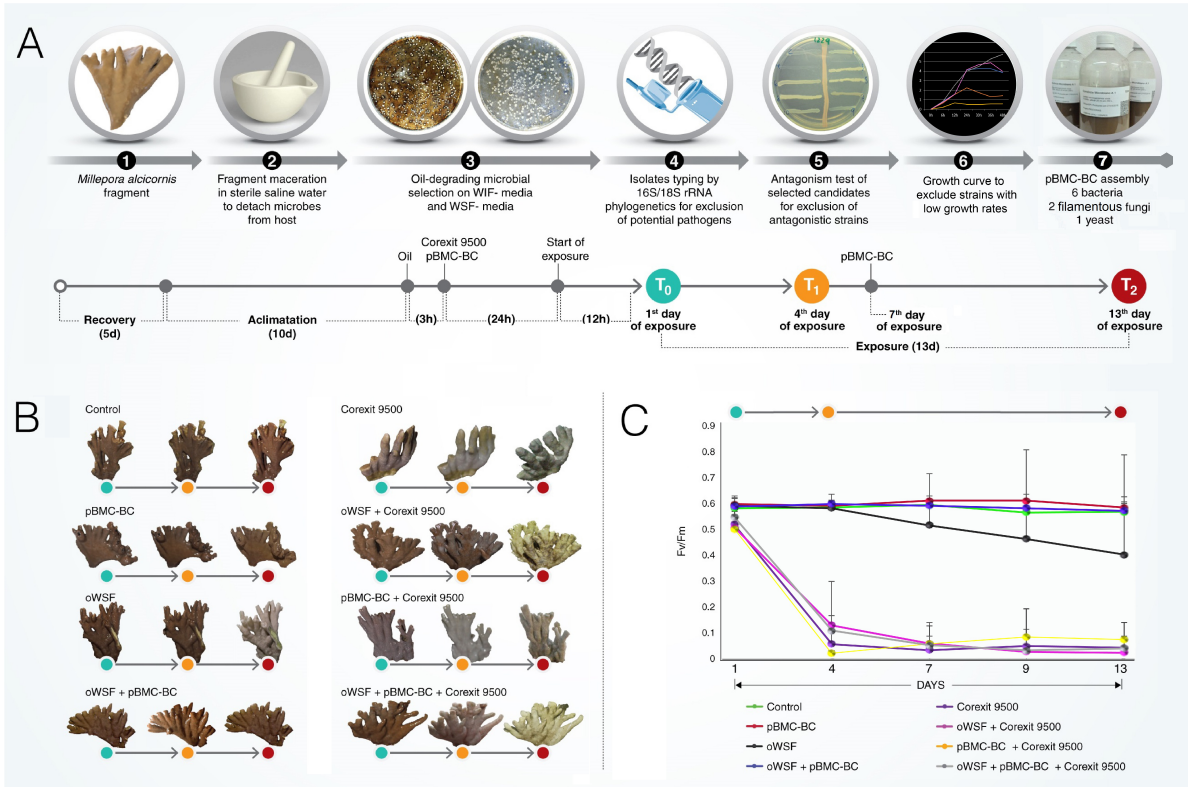


FIGURE 1 A) Steps for pBMC-BC selection and timeline of the experiment; B) Morphological changes assessed by photo documentation in the *Millepora alcicornis* fragments exposed to the treatments at T₀, T₁ and T₂; C) Photosynthetic efficiency measured by Fv/Fm at five different days of experiment, including T₀, T₁ and T₂.

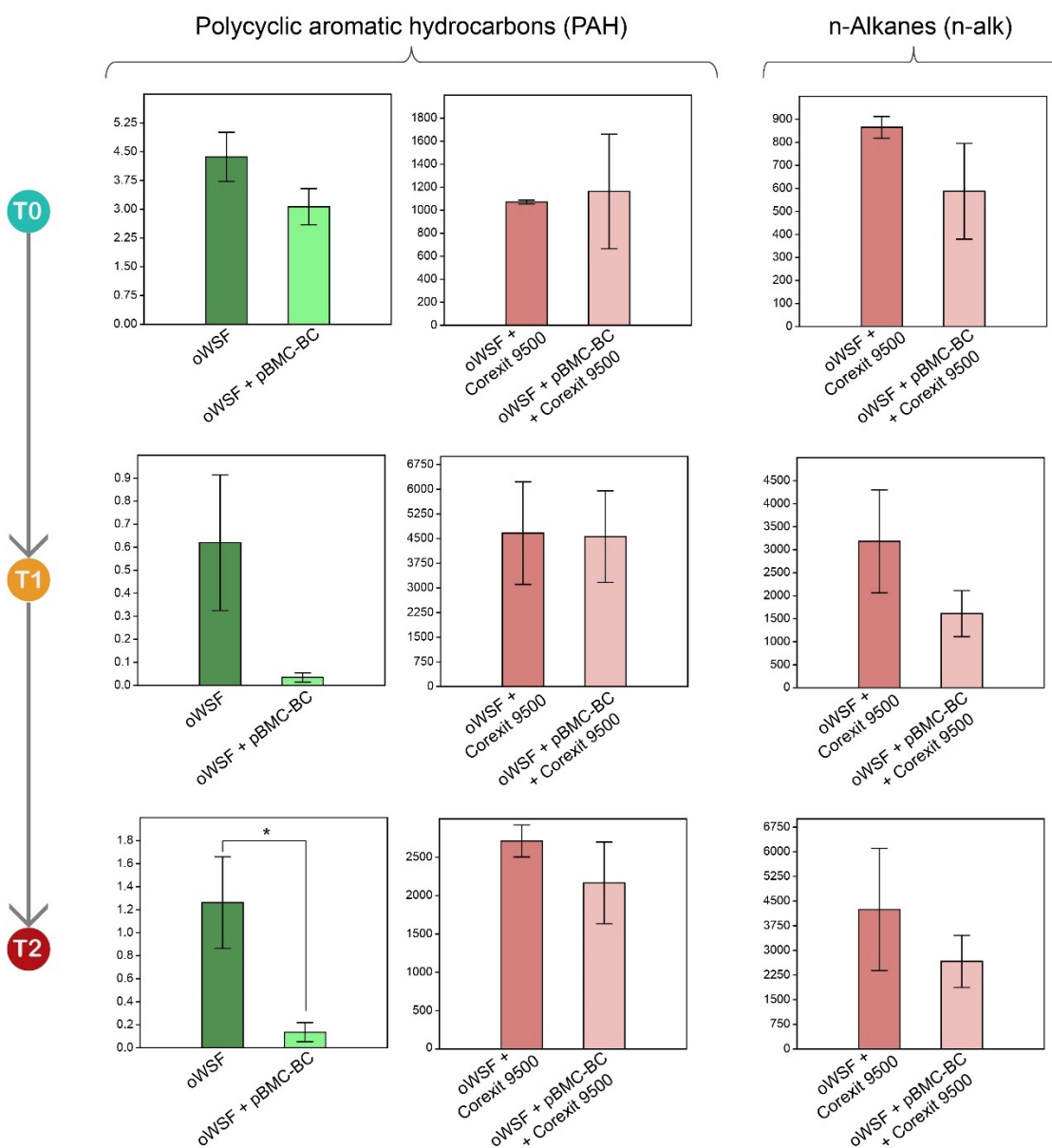


FIGURE 2 Quantification of PAH and n-alkanes in the samples where it was detectable in T₀, T₁ and T₂ throughout time.

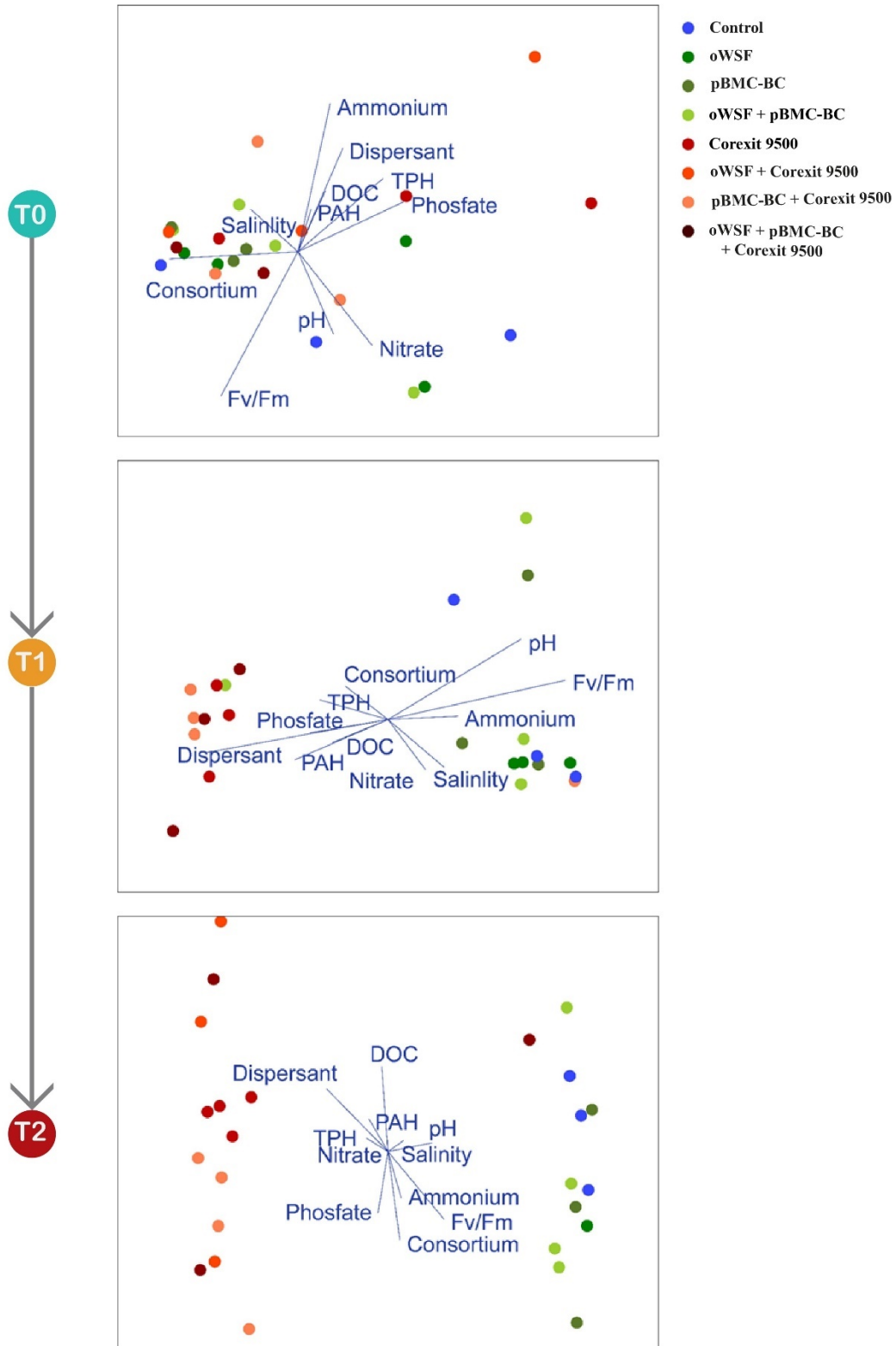


FIGURE 3 Non-metric multidimensional scaling (nMDS) ordination of *Millepora alcicornis* bacteriome communities throughout time using the Bray-Curtis similarity coefficient based on OTUs relative abundances.

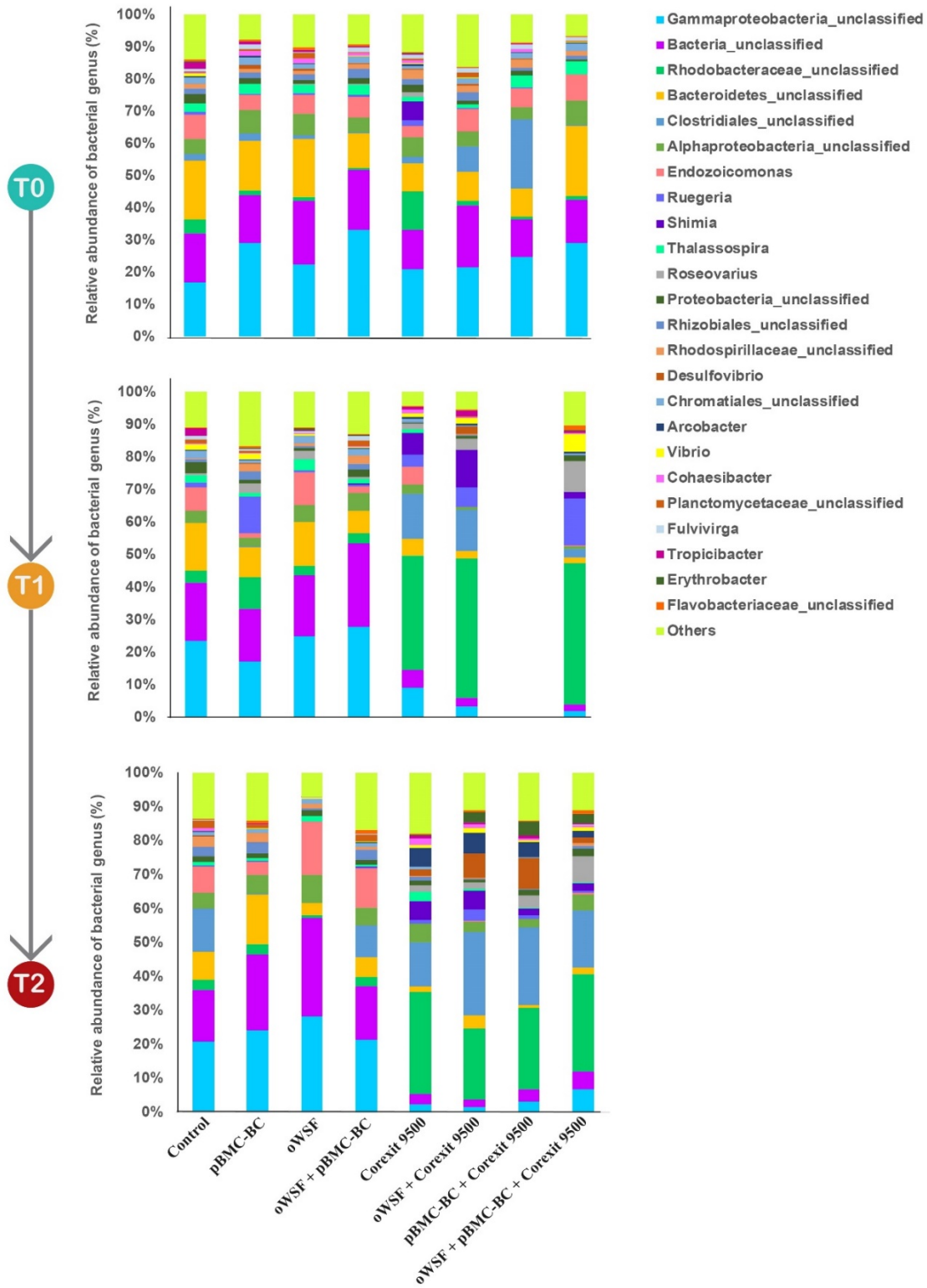


FIGURE 4 Phylogenetic distribution of the bacterial genera based on the DNA sequences obtained from the fragment of the 16S subunit of ribosomal RNA of all treatments throughout time.

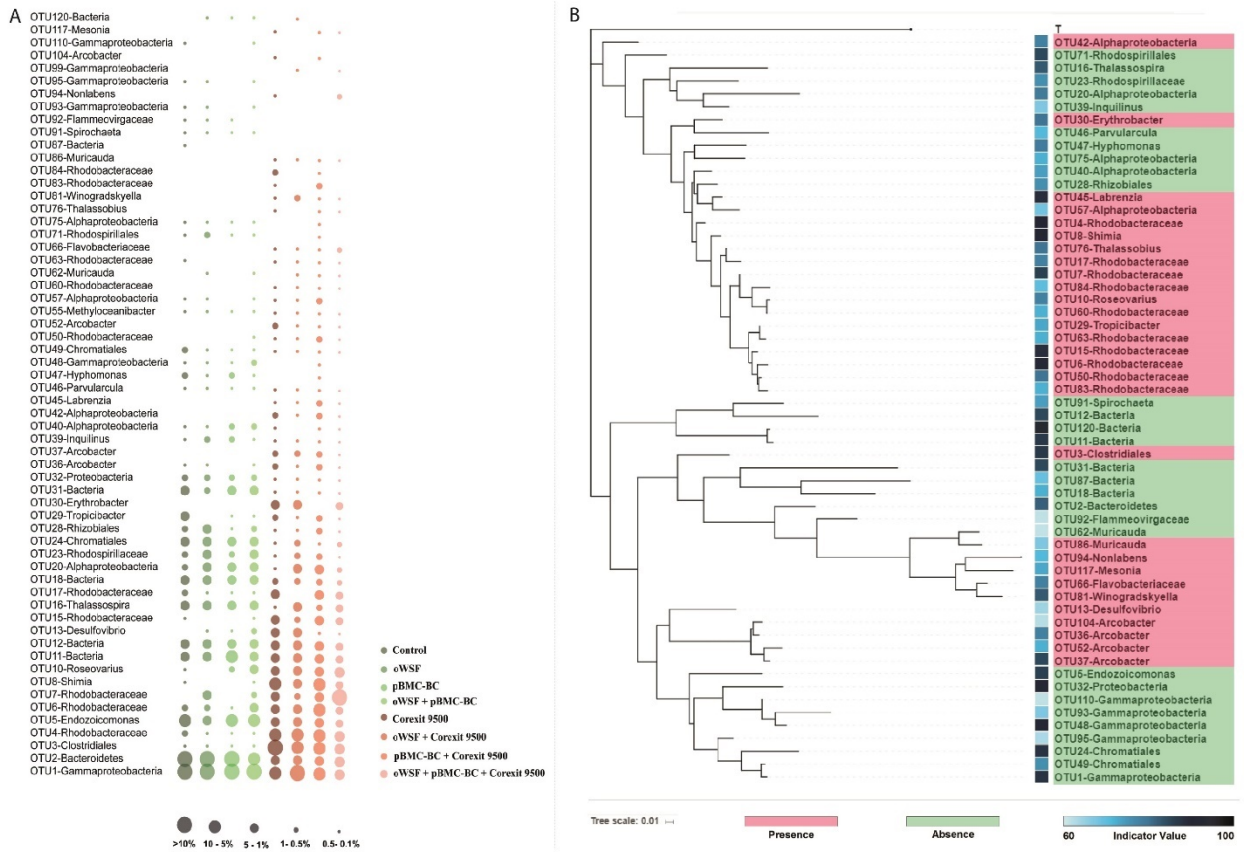


FIGURE 5 A) Relative abundance in all treatments of bioindicators of any factor that presented an indicator value >60; B) Phylogenetic tree of indicators of presence and absence of Corexit® 9500c.

TABLES LEGENDS

Table 1 Repeated measure ANOVA results and Post-Hoc comparisons of the physicochemical conditions to all treatments throughout time.

Parameters	F-value	p-value	Post-Hoc Comparisons
pH			
Time	2.03	0.14	pH values were lower the oWSF + Corexit® 9500c, Corexit® 9500c, and oWSF + pBMC-BC + Corexit® 9500c treatments (7.99, 8.05, and 8.06 ± 0.06 standard error) compared with Ctrl, oWSF + pBMC-BC and pBMC-BC that had mean values of 8.47, 8.61 and 8.54 ± 0.04.
Treatments	32.02	<0.0001	
Time:Treatments	0.58	0.86	

DOC					
	Time	11.24	<0.001		DOC concentrations increased across all treatments during the experiment and the T1 and T2 had a significantly higher DOC concentration (4.44 and 4.53 $\mu\text{g} / \text{mL} \pm 0.26$) than T0 (3.24 $\mu\text{g} / \text{mL} \pm 0.26$).
	Treatments	1.51	0.21		
	Time:Treatments	1.22	0.29		
Salinity					
	Time	78.9	<0.0001		Salinity increased slightly throughout time across all treatments by the last day of experiment (T2) (37.25 ± 0.07) relative to T0 (36.22 mg / L ± 0.07) and T1 (36.17 mg / L ± 0.07).
	Treatments	2.8	0.03		
	Time:Treatments	1.6	0.11		
Ammonium					
	Time	14.86	<0.0001		Ammonium increased from T0 (28.10 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 19.22$) to T1 (160.09 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 19.22$) but decreased again by T2 (99.83 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 19.22$).
	Treatments	1.33	0.28		
	Time:Treatments	1.07	0.41		
Nitrate					
	Time	6.88	0.002		Nitrate values increased from T0 (6.56 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 10.76$) to T1 (58.11 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 10.76$) but decreased again by T2 (34.65 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 10.76$).
	Treatments	20.86	<0.0001		PAHs levels increased in oWSF+Corexit® 9500c and oWSF+pBMC-BC+Corexit® 9500c treatments from T0 (803.19 and 1162.94 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 457.05$) to T1 (4665.46 and 76 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 457.05$). PAH levels within these treatments decreased to levels comparable to T0 by T2 (2711.75 and 2165.55 $\mu\text{g} / \text{L} \pm 457.05$), especially in treatments with pBMC-BC inoculation.
	Time:Treatments	3.31	0.001		
N-alkanes					
	Time	4.84	0.013		The concentration of n-alkane in oWSF + Corexit® 9500c and

	Treatments	9.98	<0.0001	oWSF + pBMC-BC + Corexit® 9500c treatments increased significantly at T2 (4243.57 and 2664.025 µg / L ± 597.15) when compared to T0 (865.12 and 587.57 µg / L ± 597.15).
	Time:Treatments	2.21	0.022	

|

6. CONCLUSÃO

Os ambientes marinhos que possuem atividade petrolífera estão sujeitos a derramamentos de petróleo. A maior província petrolífera do Brasil localiza-se próximo à região de Armação dos Búzios, considerada um “oásis coralíneo”. Logo, o risco associado a exploração de petróleo na região é de grande potencial destrutivo, e estudos que simulem os danos causados por um possível derramamento, assim como a eficácia de métodos de remediação, são de grande importância.

No ato do derramamento, estratégias de remediação são utilizadas. No Brasil não existem estudos consistentes dos impactos causados pelo derramamento de óleo e o uso em conjunto das estratégias de remediação química e biológica e o impacto sobre os corais e seu bacterioma associado. Esses efeitos são difíceis de serem estudados, haja vista a dificuldade de simular de forma realista a dinâmica da contaminação no ambiente marinho.

Esta tese enfrentou esta questão a partir de dois focos complementares. Na primeira, desenvolveu um sistema de mesocosmo para os estudos de derramamento de óleo, que se mostrou eficaz na simulação e monitoramento das variáveis, capaz de ser controlado para diferentes regimes operacionais e adaptável para mais de uma conformação experimental. Na segunda vertente, mostrou a importância da avaliação do impacto de um derramamento de óleo e a utilização das estratégias de remediação no coral holobionte. Revelou que o impacto do dispersante pode ser muito maior do que a própria contaminação do óleo, e que a utilização de micro-organismos selecionados pode ser uma alternativa para minimizar os efeitos do óleo, em substituição ao dispersante. Essas questões foram apresentadas a partir de dois artigos distintos.

No primeiro artigo, foi possível concluir que o desempenho do mesocosmo nos dois ensaios de validação para simular vazamentos de óleo, de magnitudes diferentes, foi eficaz. Todos os elementos avaliados na estrutura como sistema aberto de fluxo contínuo de água por gravidade tiveram êxito ao fim de ensaios com diferentes configurações.

As concentrações de óleo usadas nos ensaios avaliados foram respectivamente 0,07% e 1% v/v, e foram escolhidas para simular tanto vazamentos de óleo de baixa quanto de alta equivalência. A baixa concentração de óleo a 0,07% não foi possível

quantificar devido à baixa solubilidade do óleo em água e alto fluxo de água que foi aplicado. Entretanto, a utilização da concentração de 1% do óleo foi significativa para avaliar a capacidade do sistema de suportar uma alta concentração de óleo, simulando situações de alto risco para o ambiente marinho.

Os parâmetros de pH, temperatura e salinidade avaliados em ambos os ensaios, ficaram dentro da faixa considerada natural nas águas do mar das Praias de Armação dos Búzios, RJ. Os parâmetros da química da água (nitrito, nitrato e amônia, COD) também foram consistentes e dentro dos limites considerados adequados durante todo ao longo dos experimentos. A avaliação desses parâmetros demonstrou a capacidade do mesocosmo de controlar as condições ambientais, mesmo entre as réplicas dos tratamentos experimentais. Caso o mesocosmo fosse de sistema fechado e estático, possivelmente iria ocorrer o acúmulo desses nutrientes e a alteração desses parâmetros, causando impacto negativo no modelo biológico a ser estudado e um resultado não realista do ambiente *in situ*. Além disso, na validação biológica, a concentração de 1% do óleo afetou negativamente as microalgas fotossintéticas simbióticas da *M. Alcornis*, que o percurso do contaminante até os aquários foi validada, utilizando um fluxo de água menor através da gravidade. Portanto, este sistema atingiu o controle dos fatores abióticos e bióticos em diferentes configurações ao longo dos ensaios validados.

Além disso a estrutura do sistema, mostrou ser adaptável em dois ensaios distintos, cuja configurações diferiram em concentração de óleo, tempo de experimento, fluxo de água e fator de diluição. Essa flexibilidade favorece a ampliação de estudos que podem ser realizados com esse modelo de mesocosmo. Esse sistema representa uma oportunidade de reproduzir os derramamentos de óleo e seus efeitos nos recifes de corais da forma mais realista possível, com um sistema de fluxo aberto que simula a rota do petróleo das áreas oceânicas até o recife, com verdadeiras réplicas independentes. Trata-se de um sistema inovador, que pode ser utilizado como referência para outros grupos de pesquisa, já que todo seu desenvolvimento foi reportado de forma integral e transparente, nesta tese e em forma de artigo científico.

No segundo artigo concluiu-se que a foi possível desenvolver um consórcio microbiano degradador de óleo com potencial probiótico, isolando os micro-organismos de espécies localizadas em Armação dos Búzios e da água do mar circundante. O

consórcio pBMC- BC de multi-domínio, aplicado como uma estratégia biotecnológica de remediação, foi capaz de proteger os corais dos efeitos negativos causados pela exposição a longo prazo do óleo. O desenvolvimento deste consórcio permitiu não apenas um incremento da eficiência de biorremediação, com também uma solução para a redução dos impactos ao ambiente relacionados aos métodos de remediação. Entretanto o consórcio composto por bactérias, fungos e leveduras não protegeu o hidrocoral contra o impacto causado pelo Corexit 9500c.

Os estudos demonstraram que o COREXIT 9500Cc impactou drasticamente a fisiologia da *M. alcicornis* causando branqueamento e necrose tecidual e mudanças no bacterioma associado em menos de 96 horas. A partir desse momento o perfil do bacterioma da *M. alcicornis* submetidos a todos os tratamentos que continham COREXIT 9500C foram diferentes dos demais tratamentos. Alguns gêneros tiveram a abundância relativamente aumentada na presença do dispersante ao longo do tempo como os *Roseovarius* sp., *Erythrobacter* sp. e *Desulfovibrio* sp. que são degradadores de óleo.

Além desses gêneros citados, a maioria das bactérias degradadoras de óleo foram constatadas neste estudo como indicadoras da presença de dispersante. Isto se dá pelo fato do COREXIT 9500C dispersar frações de hidrocarbonetos na coluna d'água e essas bactérias utilizá-las em seu metabolismo. Entretanto, este desbalanço no bacterioma da *M. Alcicornis* pode ser prejudicial, levando ao rompimento das interações benéficas e aumentando a incidência de bactérias oportunistas, deixando o hidrocoral susceptível à doenças e até mesmo a morte. Neste estudo também ficou muito claro a prevalência de gêneros associados a corais saudáveis como *Endozoicomonas* sp. nos tratamentos sem dispersante, sendo esta indicadora da ausência de dispersante.

Este trabalho é precursor na exploração de respostas do bacterioma de corais à exposição ao óleo, dispersantes e consórcio biorremediador de óleo. Com isso, o impacto que este estudo tem para sociedade e para as companhias petrolíferas é o conhecimento a atuação do COREXIT 9500C em hidrocorais construtores de recifes e a necessidade de reforçar a contra-indicação da aplicação de dispersantes em áreas de biodiversidade marinha. Isso faz com que haja a necessidade de investir no uso de biossurfactante que é considerado menos agressivo ao ambiente marinho, ou em tecnologias de remediação biotecnológica, como o consórcio biorremediador e benéfico aos corais.

Portanto, a aplicação deste tipo de consórcio em recifes de corais frente a um derramamento de óleo, poderá proteger os corais a longo prazo e evitar o uso de métodos químicos, como o dispersante, que poderá causar grandes impactos no ambiente que abriga a maior diversidade marinha, os recifes de corais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SHAFY, H. I.; MANSOUR, M. S. M. A review on polycyclic aromatic hydrocarbons: Source, environmental impact, effect on human health and remediation. **Egyptian Journal of Petroleum**, v. 25, n. 1, p. 107-123, 2016.

AGÊNCIA NACIONAL DO PETRÓLEO, GÁS NATURAL E BIOCOMBUSTÍVEIS (ANP). **Dados do desempenho das indústrias do petróleo, do gás natural e dos biocombustíveis e do sistema de abastecimento nacionais no período 2008-2017**. 2019. Disponível em <<http://www.anp.gov.br/publicacoes/anuario-estatistico/anuario-estatistico-2018>>. Acesso em 15 de Abril de 2019.

AL-DAHASH, L. M.; MAHMOUD, H. M. Harboring oil-degrading bacteria: A potential mechanism of adaptation and survival in corals inhabiting oil-contaminated reefs. **Microbial Ecology**, v. 8, n. 1, p. 96–107, 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRAS DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT) 14605-2 NBR (Normas brasileiras). 2010. Armazenamento. **Projeto: Metodologia de dimensionamento de vazão, instalação, operação e manutenção para posto revendedor**. <https://www.abntcatalogo.com.br/norma>. Acessado em 02 julho de 2017.

ADAMS, M. Developing an International Oil Spill Policy Strategy for the U.S. **International Oil Spill Conference Proceedings**, p. 13–917, 2003,

AGARWAL, A; LIU, Yu. Remediation technologies for oil-contaminated sediments. **Marine Pollution Bulletin**, v. 101, n. 2, p. 483–490, 2015.

AINSWORTH, T. D. WASMUND, K.; UKANI, L.; SENECA, F.; YELLOWLEES, D.; MILLER, D.; LEGGAT, W. Defining the tipping point. A complex cellular life/death balance in corals in response to stress. **Scientific Reports**, v. 1, n. 1, p. 160, 2011.

AINSWORTH, T. D; HOEGH-GULDBERG, O. Bacterial communities closely associated with coral tissues vary under experimental and natural reef conditions and thermal stress. **Aquatic Biology**, v. 4, p. 289–296, 2009.

ALBAIGÉS, J.; KIENHUIS, P. G. M.; DAHLMANN, G. Oil Spill Identification. **Handbook of Oil Spill Science and Technology**, Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., p. 165–204, 2015.

ALLEMAND, D.; OSBORN, D. Ocean acidification impacts on coral reefs: From sciences to solutions. **Regional Studies in Marine Science**, v. 28, p. 100558, 2019.

AMARAL, F. M.D.; STEINER, A. Q.; BROADHURST, M. K.; CAIRNS, S. D.. An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (Hydrozoa: Cnidaria), including the description of a new species. **Zootaxa**, n. 1930, p. 56–68, 2008.

ATLAS, R. M; HAZEN, T. C. Oil Biodegradation and Bioremediation: A Tale of the Two

Worst Spills in U.S. History. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 16, p. 6709–6715, 2011.

BAKER, A. C. Flexibility and Specificity in Coral-Algal Symbiosis: Diversity, Ecology, and Biogeography of Symbiodinium. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, n. 1, p. 661–689, 2003.

BARNES, R. S.K.; HUGHES, R. N. **An Introduction to Marine Ecology**, 3 ed. Oxford, United Kingdom, Blackwell Publishing, 2009.

BAYAT, A.; AGHAMIRI, S. F.; MOHEB, A.; VAKILI-NEZHAAD, G. R. Oil Spill Cleanup from Sea Water by Sorbent Materials. **Chemical Engineering & Technology**, v. 28, n. 12, p. 1525–1528, 2005.

BAYER, T.; NEAVE, M. J.; ALSHEIKH-HUSSAIN, A.; ARANDA, M.; YUM, L. K. The Microbiome of the Red Sea Coral *Stylophora pistillata* Is Dominated by Tissue-Associated Endozoicomonas Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 427, 2013.

BELLWOOD, D. R.; HUGHES, T. P.; FOLKE, C.; NYSTRÖM, M. Confronting the coral reef crisis. **Nature**, v. 429, n. 6994, p. 827–833, 2004.

BLASCO, J.; CHAPMAN, P. M.; CAMPANA, O.; HAMPEL, M. **Marine Ecotoxicology: Current Knowledge and Future Issues.**, 1 ed, Elsevier, 2016.

BRUNO, J. F.; CÔTÉ, I. M.; TOTH, L. T. Climate Change, Coral Loss, and the Curious Case of the Parrotfish Paradigm: Why Don't Marine Protected Areas Improve Reef Resilience? **Annual Review of Marine Science**, v. 11, n. 1, p. 307–334, 2019.

BURKE, L.; REYTAR, K.; SPALDING, M.; PERRY, A. **Reefs at Risk Revisited**. World Resources Institute (WRI), Washington D.C, Estados Unidos, 114p, 2011.

CAIRNS, S. D; HOEKSEMA, B W; VAN DER LAND, J. Appendix: List of Extant Stony Corals. **Atoll Research Bulletin**, 1999.

CAPORASO, J. G.; LAUBER, C. L.; WALTERS, W. A.; BERG-LYONS, D.; LOZUPONE, C. A.; TURNBAUGH, P. J.; FIERER, N.; KNIGHT, R. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 1, p. 4516–4522, 2011.

CAPPELLO, S.; CARUSO, G.; ZAMPINO, D.; MONTICELLI, L. S.; MAIMONE, G.; DENARO, R.; TRIPODO, B.; TROUSSELLIER, M.; YAKIMOV, M.; GIULIANO, L. Microbial community dynamics during assays of harbour oil spill bioremediation: A microscale simulation study. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 1, p. 184–194, 2007.

CAPPELLO, S.; GENOVESE, M.; DELLA TORRE, C.; CRISARI, A.; ASSANSHAHIAN,

M.; SANTISI, S.; CALOGERO, R.; YAKIMOV, M. M. Effect of bioemulsificant exopolysaccharide (EPS2003) on microbial community dynamics during assays of oil spill bioremediation: A microcosm study. **Marine Pollution Bulletin**, v. 64, n. 12, p. 2820-2828, 2012.

CARUSO, G.; DENARO, R.; GENOVESE, M.; GIULIANO, L.; MANCUSO, M.; YAKIMOV, M. New methodological strategies for detecting bacterial indicators. **Chemistry and Ecology**, v. 3, n. 20, p.167-181, 2004.

CEH, J.; KILBURN, M. R.; CLIFF, J. B.; RAINA, J.; VAN KEULEN, M.; BOURNE, D. G. Nutrient cycling in early coral life stages: *Pocillopora damicornis* larvae provide their algal symbiont (Symbiodinium) with nitrogen acquired from bacterial associates. **Ecology and Evolution**, v. 3, n. 8, p. 2393–2400, 2013.

CERNIGLIA, C. E.; SUTHERLAND, J. B. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Fungi. In: **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 2079–2110, 2010.

CERQUEIRA, V. S.; PERALBA, M. R.; CAMARGO, F. A.O.; BENTO, F. M. Comparison of bioremediation strategies for soil impacted with petrochemical oily sludge. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 95, p. 338–345, 2014.

CLEMENTE, S.; RODRÍGUEZ, A.; BRITO, A.; RAMOS, A.; MONTERROSO, Ó.; HERNÁNDEZ, J. C. On the occurrence of the hydrocoral *Millepora* (Hydrozoa: Milleporidae) in the subtropical eastern Atlantic (Canary Islands): is the colonization related to climatic events? **Coral Reefs**, v. 30, n. 1, p. 237–240, 2011.

COLOMBO-PALLOTTA, M. F.; RODRÍGUEZ-ROMÁN, A.; IGLESIAS-PRIETO, R. Calcification in bleached and unbleached *Montastraea faveolata*: Evaluating the role of oxygen and glycerol. **Coral Reefs**, v. 329 n. 4, p. 899-907, 2010.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2011.

CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE (Brasil). Resolução nº 472, de 27 de novembro de 2015. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 2015

COOPER, T. F.; GILMOUR, J. P.; FABRICIUS, K. E. Bioindicators of changes in water quality on coral reefs: review and recommendations for monitoring programmes. **Coral Reefs**, v. 28, n. 3, p. 589–606, 2009.

COSTANZA, R.; DE GROOT, R.; SUTTON, P.; VAN DER PLOEG, S.; ANDERSON, S. J.; KUBISZEWSKI, I.; FARBER, S.; TURNER, R. K. Changes in the global value of ecosystem services. **Global Environmental Change**, v. 26, p. 152-158, 2014

COSTANZA, R.; D'ARGE, R.; DE GROOT, R.; FARBER, S.; GRASSO, M.; HANNON, B.; LIMBURG, K.; NAEEM, S.; O'NEILL, R. V.; PARUELO, J.; RASKIN, R. G.; SUTTON, P.;

VAN DEN BELT, M. The value of the world's ecosystem services and natural capital. **Nature**, v. 387, n. 6630, p. 253-260.1997.

CULP, J. M.; YATES, A. G.; ARMANINI, D. G.; BAIRD, D. J. Establishing Cause-Effect Relationships in Multistressor Environments. **Methods Stream Ecol.**, 3 ed., p. 335-351, 2017.

DA SILVA, M.; PASSARINI, M. R Z.; BONUGLI, R. C.; SETTE, L. D. Cnidarian-derived filamentous fungi from Brazil: Isolation, characterisation and RBBR decolourisation screening. **Environmental Technology**, v. 29, n. 12, p. 1331-1339, 2008.

DA SILVA, M. L. B.; ALVAREZ, P. J. J. Bioaugmentation. **Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology**, p. 4531-454, Springer Berlin Heidelberg. 2009.

DELEO, D. M.; RUIZ-RAMOS, D. V.; BAUMS, I. B.; CORDES, E. Response of deep-water corals to oil and chemical dispersant exposure. **Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography**, v. 129, p. 137–147, 2016.

DOUGLAS, A. E. The Ecology of Symbiotic Micro-organisms. **Advances in Ecological Research**, p.69-103, 1995.

DOUGLAS, A E. Coral bleaching—how and why? **Marine pollution bulletin**, v. 46, n. 4, p. 385–392, 2003.

DUARTE, G.; CALDERON, E. N.; PEREIRA, C. M.; MARANGONI, L. F. B.; SANTOS, H. F.; PEIXOTO, R. S.; BIANCHINI, A.; CASTRO, C. B. A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. **Ecology and Evolution**, v. 5, n. 20, p. 4555–4566, 2015.

DUBINSKY, Z.; STAMBLER, N. Marine pollution and coral reefs. **Global Change Biology**, v. 2, n. 6, p. 511-526, 1996.

DUFRENE, M.; LEGENDRE, P. Species Assemblages and Indicator Species: The Need for a Flexible Asymmetrical Approach. **Ecological Monographs**,v. 67, n. 3, p. 345, 1997.

DUNLAP, W. C; SHICK, J M. Ultraviolet radiation-absorbing mycosporine-like amino acids in coral reef organisms: a biochemical and environmental perspective. **Journal of Phycology**, v. 34, n. 3, p. 418–430, 1998.

DUTRA, L.X.C., KIKUCHI, R.K.P. & LEÃO, Z.M.A.N. Thirteen months monitoring coral bleaching on Bahia's north coast, Brazil. **Proceed. 9th Int. Coral Reef Symp.** Indonesian Institute of Sciences, Bali, p.373, 2000.

EPSTEIN, N.; BAK, R. P M; RINKEVICH, B. Toxicity of third generation dispersants and dispersed Egyptian crude oil on Red Sea coral larvae. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 6, p. 497–503, 2000.

ESSIEN, J. P.; ANTAI, S. P.; OLAJIRE, A. A. Distribution, Seasonal Variations and Ecotoxicological Significance of Heavy Metals in Sediments of Cross River Estuary Mangrove Swamp. **Water, Air, and Soil Pollution**, v. 197, n. 1, p. 91–105, 2009.

FERREIRA; MAIDA. Monitoramento dos recifes de coral do Brasil. Monitoramento dos recifes de coral do Brasil, **Ministério do Meio ambiente**, 2006.

GANDRA, R. M. Impacto da participação especial em campos gigantes offshore de petróleo. **Production**, v. 16, n. 2, p. 274–286, 2006.

GARREN, M.; AZAM, F. New directions in coral reef microbial ecology. **Environmental Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 833–844, abr. 2012.

GATES, R. D.; AINSWORTH, T. D. The nature and taxonomic composition of coral symbiomes as drivers of performance limits in scleractinian corals. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 408, n. 1–2, p. 94–101, 2011.

GATES, R. D.; EOMUND, P. J. The physiological mechanisms of acclimatization in tropical reef corals. **American Zoologist**, v. 39, n. 1, p. 30–43, 1999.

GENTRY, T; RENSING, C.; PEPPER, I. New Approaches for Bioaugmentation as a Remediation Technology. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, v. 34, n. 5, p. 447– 494, 2004.

GIEG, Lisa M.; SUFLITA, Joseph M. Metabolic Indicators of Anaerobic Hydrocarbon Biodegradation in Petroleum-Laden Environments. **Petroleum Microbiology**, p.337-356, 2014.

GIOVANNONI, S J.; STINGL, U. Molecular diversity and ecology of microbial plankton. **Nature**. v. 437, n. 7057, p. 343-348, 2005.

GOODBODY-GRINGLEY, G.; WETZEL, D. L.; GILLON, D.; PULSTER, E.; MILLER, A.; RITCHIE, K. B. Toxicity of Deepwater Horizon Source Oil and the Chemical Dispersant, Corexit® 9500, to Coral Larvae. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

GOREAU, T. F.; GOREAU, N. I.; GOREAU, T. J. Corals and Coral Reefs. **Scientific American**, v. 241, n. 2, p. 124–136, 2010.

GRAHAM, W. M.; CONDON, R. H. CARMICHAEL, R. H. D'AMBRA, I.; PATTERSON, H. K.; LINN, L. J.; HERNANDEZ JR, F. J. Oil carbon entered the coastal planktonic food web during the Deepwater Horizon oil spill. **Environmental Research Letters**, v. 5, n. 4, p. 045301, 2010.

GUTIÉRREZ, N.; HILBORN, R.; DEFEO, O.; CLARKE, K.; GORLEY, R.; BARRIENTOS, I.; VILLEGAS-ZURITA F.; CASTILLEJOS-MOGUEL, F.; BENÍTEZ-VILLALOBOS, F.; URBÁN-RAMÍREZ, J. Getting started with PRIMER v7 Plymouth Routines in Multivariate Ecological Research. **Revista Mexicana de Biodiversidad**, v.89, n. 3, 2018.

HAAPKYLÄ, J.; RAMADE, F; SALVAT, B. Oil pollution on coral reefs: A review of the state of knowledge and management needs, **Vie et Milieu**, v.57, 2007.

HEAD, I. M.; JONES, D. M.; RÖLING, W. F.M. Marine microorganisms make a meal of oil. **Nature reviews. Microbiology**. v. 4, n. 3, p. 173–182 , 2006

HENLEY, W. F.; PATTERSON, M. A.; NEVES, R. J.; DENNIS L. A. Effects of Sedimentation and Turbidity on Lotic Food Webs: A Concise Review for Natural Resource Managers. **Reviews in Fisheries Science**, v. 8, n. 2, p. 125–139, 2000.

HINRICHSEN, D. Reefs at risk. Defenders, **World Resources Institutes**, 1999.

HOEGH-GULDBERG, O.; MUMBY, P. J.; HOOTEN, A. J.; STENECK, R. S.; GREENFIELD, P.; GOMEZ, E.; HARVELL, C. D.; SALE, P. F.; EDWARDS, A. J.; CALDEIRA, K.; KNOWLTON, N.; EAKIN, C. M.; IGLESIAS-PRIETO, R.; MUTHIGA, N.; BRADBURY, R. H.; DUBI, A.; HATZIOLOS, M. E. Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science**, v. 318, n. 5857, p. 1737-1742, 2007.

HOEGH-GULDBERG, O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine and Freshwater Research**, v. 50, n. 8, p. 839, 1999.

HUGHES, T. P.; CONNELL, J. H. Multiple stressors on coral reefs: A long -term perspective. **Limnology and Oceanography**, v. 44, n. 3, p. 932–940, 1999.

HUGHES, T. P.; KERRY, J. T.; ÁLVAREZ-NORIEGA, M.; ÁLVAREZ-ROMERO, J. G.; ANDERSON, K. D.; BAIRD, A. H.; BABCOCK, R. C.; BEGER, M.; BELLWOOD, D. R.; BERKELMANS, R.; BRIDGE, T. C.; BUTLER, I. R.; BYRNE, M.; CANTIN, N. E.; COMEAU, S.; CONNOLLY, S. R.; CUMMING, G. S.; DALTON, S. J.; DIAZ-PULIDO, G.; EAKIN, C. M.; FIGUEIRA, W. F.; GILMOUR, J. P.; HARRISON, H. B.; HERON, S. F.; HOEY, ANDREW S.; HOBBS, J. P. A.; HOOGENBOOM, M. O.; KENNEDY, E. V.; KUO, C. Y.; LOUGH, J. M.; LOWE, R. J.; LIU, G.; MCCULLOCH, M. T.; MALCOLM, H. A.; MCWILLIAM, M. J.; PANDOLFI, J. M.; PEARS, R. J.; PRATCHETT, M. S.; SCHOEPF, V.; SIMPSON, T.; SKIRVING, W. J.; SOMMER, B.; TORDA, G.; WACHENFELD, D. R.; WILLIS, B. L.; WILSON, S. K. Global warming and recurrent mass bleaching of corals. **Nature**, v. 543, p. 373, 2017.

IGUCHI, A.; IWANAGA, S; NAGAI, H. Isolation and characterization of a novel protein toxin from fire coral. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 365, n. 1, p. 107–112, 2008.

INTERNATIONAL PETROLEUM INDUSTRY ENVIRONMENTAL CONSERVATION ASSOCIATION - IPIECA. At-sea monitoring of surface dispersant effectiveness. **IPIECA/IOPG Oil Spill Response JIP.**, 2014.

JANOUSKOVEC, J.; HORAK, A.; OBORNIK, M.; LUKES, J.; KEELING, P. J. I. Global analysis of plastid diversity reveals apicomplexan-related lineages in coral reefs. **Current Biology**, v. 22, n. 13, p. R518–R519, 2012.

JERMYN, W. S; BOYD, E F.. Characterization of a Novel *Vibrio* Pathogenicity Island (VPI-2) Encoding Neuraminidase (NanH) among Toxigenic *Vibrio Cholerae* Isolates. **Microbiology (Reading, England)**, v. 148, n. 11, p. 3681–3693, 2002.

JERNELÖV, A; LINDÉN, O. Ixtoc I: A case study of the world's largest oil spill. **Allen press**, v.10, n.6, p. 299-306, 1981.

KARLSON, R. H.; CORNELL, H. V. Species richness of coral assemblages: Detecting regional influences at local spatial scales, **Ecology**, v. 83, n. 2, p. 452-463, 2002.

KIMES, N. E.; VAN NOSTRAND, J. D.; WEIL, E.; ZHOU, J.; MORRIS, P. J. Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 2, p. 541–556, 2010.

KINSMAN, D. J. J. Reef coral tolerance of high temperatures and salinities. **Nature**, v. 202, n. 4939, p. 1280–1282, 1964.

LA, S. Novel Tools for the Evaluation of the Health Status of Coral Reefs Ecosystems and for the Prediction of Their Biodiversity in the Face of Climatic Changes. **Topic in. Oceanographs**, 2013.

LABOREL, J. Madreporaires et hydrocoralliaires récifaux des côtes Brésiennes. Systématique, écologie, répartition verticale et géographique. **Ann. Inst. Océanogr.**, v. 47, p. 171-229, 1969.

LABOREL, J. West African reef corals: a hypothesis on their origin. **Proceedings of the Second International Coral Reef**, v.19, 1974.

LAWLER, S. N.; KELLOGG, C.A.; FRANCE, S. C.; CLOSTIO, RACHEL W.; BROOKE, S. D. ; ROSS, S. W. . Coral-Associated Bacterial Diversity Is Conserved across Two Deep-Sea *Anthothela* Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 5, 2016.

KARLSON, R. H.; CORNELL, H. V. Species richness of coral assemblages: Detecting regional influences at local spatial scales, **Ecology**, v. 83, n. 2, p. 452-463, 2002.

KIMES, N. E.; VAN NOSTRAND, J. D.; WEIL, E.; ZHOU, J.; MORRIS, P. J. Microbial functional structure of *Montastraea faveolata*, an important Caribbean reef-building coral, differs between healthy and yellow-band diseased colonies. **Environmental microbiology**, v. 12, n. 2, p. 541–556, 2010.

KINSMAN, D. J. J. Reef coral tolerance of high temperatures and salinities. **Nature**, v. 202, n. 4939, p. 1280–1282, 1964.

LA, S. Novel Tools for the Evaluation of the Health Status of Coral Reefs Ecosystems and for the Prediction of Their Biodiversity in the Face of Climatic Changes. **Topic in. Oceanographs**, 2013.

LABOREL, J. Madreporaires et hydrocoralliaires récifaux des côtes Brésiliennes. Systématique, écologie, répartition verticale et géographique. **Ann. Inst. Océanogr.**, v. 47, p. 171-229, 1969.

LABOREL, J. West African reef corals: a hypothesis on their origin. **Proceedings of the Second International Coral Reef**, v.19, 1974.

LAWLER, S. N.; KELLOGG, C.A.; FRANCE, S. C.; CLOSTIO, RACHEL W.; BROOKE, S. D. ; ROSS, S. W. . Coral-Associated Bacterial Diversity Is Conserved across Two Deep-Sea Anthothela Species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. 5, 2016.

LEAHY, J G; COLWELL, R R. Microbial degradation of hydrocarbons in the environment. **Microbiological reviews**, v. 54, n. 3, p. 305–315,1990.

LEÃO, Z. M.A.N.; OLIVEIRA, M D M; KIKUCHI, Ruy K P. Os Recifes de Coral da APA Ponta da Baleia, Bahia. **OLAM Ciência & Tecnologia**, v. 8, n. 1, p. 287–315, 2008.

LEMA, K. A.; WILLIS, B. L.; BOURNEB, D. G. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 78, n. 9, p. 3136–3144, 2012.

LENTH, R.; LENTH, M. R. Package 'lsmeans'. **The American Statistician**, v. 34, n. 4, p. 216–221, 2018.

LESSARD, R .R; DEMARCO, G. The Significance of Oil Spill Dispersants. **Spill Science & Technology Bulletin**, v. 6, n. 1, p. 59–68, 2000.

LESSER, M. P. Coral reef bleaching and global climate change: Can corals survive the next century? **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 13, p. 5259–5260, 2007.

LEWIS, J. B. Biology and Ecology of the Hydrocoral *Millepora* on Coral Reefs. **Advances in Marine Biology**. v. 8 n. 1, p. 99-107, 2006.

LINTON, D. M.; WARNER, G. F. Biological indicators in the Caribbean coastal zone and their role in integrated coastal management. **Ocean & Coastal Management**, v. 46, n. 3–4, p. 261–276, jan. 2003.

LITTMAN, R. A.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Bacterial communities of juvenile corals infected with different Symbiodinium (dinoflagellate) clades. **Marine Ecology Progress Series**, v. 383, p. 454-59, 2009.

LOYA, Y; RINKEVICH, B. Abortion Effect in Corals Induced by Oil Pollution. **Marine Ecology Progress Series**, v. 1, n. 1976, p. 77–80, 2007.

LUCKETT, Christopher et al. Coral reef mesocosms and microcosms — successes, problems, and the future of laboratory models. **Ecological Engineering**, v. 6, n. 1–3, p. 57–72, 1996.

MAIDA, M.; FERREIRA, B. P. Coral reefs of Brazil: an overview. **8th International Coral Reef Symposium 1997**.

MARCHESI, J. R.; RAVEL, J. The vocabulary of microbiome research: a proposal. **Microbiome**, v. 3, n. 1, p. 31, 2015.

MCCUNE, B.; MEFFORD, M. J. **PC-ORD. Multivariate Analysis of Ecological Data. Version 6. MjM Software**, 2011

MCDEVITT-IRWIN, J. M.; BAUM, J. K.; GARREN, M.; VEGA THURBER, R. L. . Responses of Coral-Associated Bacterial Communities to Local and Global Stressors. **Frontiers in Marine Science**, v. 4, p. 1–16, 2017.

MERCER, K.; TREVORS, J. T. Remediation of oil spills in temperate and tropical coastal marine environments. **The Environmentalist**, v. 31, n. 3, p. 338–347, 2011.

MILLER, A. W; RICHARDSON, L. L. A meta-analysis of 16S rRNA gene clone libraries from the polymicrobial black band disease of corals. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 2, p. 231–241, 2011.

MORTAZAVI, B.; HOREL, A.; BEAZLEY, M. J.; SOBECKY, P. A. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 537–544, jan. 2013.

MIZRACHI, I.; LOYA, Y.; ROSENFELD, M.; KRAMARSKI-WINTER, E.; YAM, R.; SHEMESH, A. The buildup of the isotopic signal in skeletons of the stony coral *Porites lutea*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 24, p. 7021–7030, 2010.

MOBERG, F; FOLKE, C. Coral reefs goods and services.pdf. **Ecological Economics**. **Ecological Economics** v. 29, n. 2, p. 215–233, 1999

MERCER, K.; TREVORS, J. T. Remediation of oil spills in temperate and tropical coastal marine environments. **The Environmentalist**, v. 31, n. 3, p. 338–347, 2011.

MILLER, A. W.; RICHARDSON, L. L. A meta-analysis of 16S rRNA gene clone libraries from the polymicrobial black band disease of corals. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 75, n. 2, p. 231–241, 2011.

MORTAZAVI, B.; HOREL, A.; BEAZLEY, M. J.; SOBECKY, P. A. Intrinsic rates of petroleum hydrocarbon biodegradation in Gulf of Mexico intertidal sandy sediments and its enhancement by organic substrates. **Journal of Hazardous Materials**, v. 244–245, p. 537–544, jan. 2013.

MIZRACHI, I.; LOYA, Y.; ROSENFELD, M.; KRAMARSKI-WINTER, E.; YAM, R.; SHEMESH, A. The buildup of the isotopic signal in skeletons of the stony coral *Porites lutea*. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 74, n. 24, p. 7021–7030, 2010.

MOBERG, F.; FOLKE, C. Coral reefs goods and services.pdf. *Ecological Economics*. **Ecological Economics** v. 29, n. 2, p. 215–233, 1999

MORGAN, P. Microbiological methods for the cleanup of soil and ground water contaminated with halogenated organic compounds. **FEMS Microbiology Letters**, v. 63, n. 4, p. 277–300, 1989.

NEGRI, A. P.; UTHICKE, S.; F. MUELLER, J.. Chemical Pollution on Coral Reefs: Exposure and Ecological Effects. **Ecological Impacts of Toxic Chemical**, p. 187–211, 2011 .

NORDVIK, A. B.; SIMMONS, J. L.; BITTING, K. R.; LEWIS, A.; STRØM-KRISTIANSEN, T. Oil and water separation in marine oil spill clean-up operations. **Spill Science and Technology Bulletin**, v. 3, n.3, p. 107-122, 1996.

O'DONNELL, K. *Fusarium and its near relatives*. In: **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics**. CAB International, Wallingford, United Kingdom. pp. 225–233, 1993.

ODUM, Eugene P. The Mesocosm. **BioScience**, v. 34, n. 9, p. 558–562, 1984.

OLIVEIRA, M. D. M.; LEÃO, Z. M. A. N.; KIKUCHI, R. K. P. Cultivo de *Millepora alcicornis* como uma ferramenta para Restauração e Manejo dos Ecossistemas Recifais do Nordeste do Brasil. **Revista de Gestão Costeira Integrada**, v. 8, n. 2, p. 183-201, 2013.

PAGNIN, S. Formação de biofilmes em aço superduplex UNS S32750 em sistema dinâmico. 109 F. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Materiais e Metalurgia) – Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

PANDEY, J.; CHAUHAN, A.; JAIN, R. K. Integrative approaches for assessing the ecological sustainability of in situ bioremediation. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 2, p. 324–375, mar. 2009.

PANDOLFI, J. M.; CONNOLLY, S. R.; MARSHALL, D. J.; COHEN, A. L. Projecting Coral Reef Futures Under Global Warming and Ocean Acidification. **Science**, v. 333, n. 6041, p. 418–422, 2011.

PARSONS, T. R.; LALLI, C. M. Comparative oceanic ecology of the plankton communities of the subarctic Atlantic and Pacific oceans. **Oceanography and Marine Biology Annual Review: in Aberdeen University**, v. 26:, p. 317-359,1988

PEARSE, V. B.; MUSCATINE, L. role of symbiotic algae (zooxanthellae) in coral calcification. **The Biological Bulletin**, v. 141, n. 2, p. 350–363, 2007.

PEIXOTO, R. S.; VERMELHO, A. B.; ROSADO, A. S. Petroleum-Degrading Enzymes: Bioremediation and New Prospects. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–7, 2011.

PEIXOTO, R. S.; ROSADO, P. M.; LEITE, D. C. A.; ROSADO, A. S.; BOURNE, D. G. Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, 2017.

PETERSEN, J. E.; CORNWELL, J. C.; KEMP, W. M. Implicit Scaling in the Design of Experimental Aquatic Ecosystems. **Oikos**, v. 85, n. 1, p. 3, 2007.

PETERSON, C. H.; RICE, S. D.; SHORT, J. W.; ESLER, D.; BODKIN, J. L.; BALLACHEY, B. E.; IRONS, D. B. . Long-Term Ecosystem Response to the Exxon Valdez Oil Spill. **Science**, v. 302, n. 5653, p. 2082 – 2086, 2003.

PINHEIRO J.; BATES D.; DEBROY S.; SARKAR D. R CORE TEAM. Package 'nlme' Title Linear and Nonlinear Mixed Effects Models. **R package version 3.1-129**, 2017. <URL: <https://CRAN.R-project.org/package=nlme>> acessado em 17 de fevereiro de 2019.

POLLOCK, F. J.; MCMINDS, R.; SMITH, S.; BOURNE, D. G.; WILLIS, B. L.; MEDINA, M.; VEGA THURBER, R.; ZANEVELD, J. R. I. Coral-associated bacteria demonstrate phylosymbiosis and cophylogeny. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–13, 2018.

PRINCE, R. C.; AMANDE, T. J.; MCGENITY, T. J. Prokaryotic Hydrocarbon Degraders. **Taxon. Genomics Ecophysiol. Hydrocarb. Microbes**, p. 1-41, 2018.

PUTNAM, H. M.; BAROTT, K. L.; AINSWORTH, T. D.; GATES, R. D. The Vulnerability and Resilience of Reef-Building Corals. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p. R528-R540, 2017.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <<https://www.R-project.org/>> Acessado em 19 de janeiro de 2019.

RÄDECKER, N.; POGOREUTZ, C.; VOOLSTRA, C. R.; WIEDENMANN, J.; WILD, C. Nitrogen cycling in corals: The key to understanding holobiont functioning? **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 8, p. 490–497, 2015.

RADJASA, O. K.; WIESE, J.; SABDONO, A.; IMHOFF, J. F.; JAVA, C.; STUDIES, M.; PURAYA, W. Corals as Source of Bacteria with Antimicrobial Activity. **Journal of Coastal Development**, 2008.

RAINA, J.; TAPIOLAS, D.; WILLIS, B. L.; BOURNE, D. G. Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 75, n. 11, p. 3492–3501, 2009.

RAINA, J.; TAPIOLAS, D.; FORÊT, S.; LUTZ, A.; ABREGO, D.; CEH, J.; SENECA, F. O.; CLODE, P. L.; BOURNE, D. G.; WILLIS, B. L.; MOTTI, C. A. DMSP biosynthesis by an animal and its role in coral thermal stress response. **Nature**, v. 14, n. 1, p. 229-239, 2013.

REAKA-KUDLA, M. L. The Global Biodiversity of Coral Reefs: A Comparison with Rain Forests. **Biodiversity II: Understanding and Protecting Our Biological Resources**, 1997.

RESHEF, L. et al. The coral probiotic hypothesis. **Environmental microbiology**, v. 8, n. 12, p. 2068–2073, dez. 2006

REILLY, T. J. The Use of Mesocosms in Marine Oil Spill Ecological Research and Development. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, n. 1, p. 153–160, 2007.

REYNIER, M. V. Effects of a simulated oil spill on a coastal plankton community. 131 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

RICHMOND, R. H. Coral Reefs: Present Problems and Future Concerns Resulting from Anthropogenic Disturbance. **American Zoologist**, v. 33, n. 6, p. 524–536, 1993.

RIEBESSELL, U.; FABRY, V. J.; HANSSON, L.; GATTUSO, J. P. Guide to Best Practices in Ocean Acidification Research and Data Reporting. **Report of international research workshop on best practices for ocean acidification research**, 2010.

- RINKEVICH, B; LOYA, Y. The reproduction of the Red Sea coral *Stylophora pistillata*. I. Gonads and planulae. **Marine Ecology Progress Series**, v.1, p. 133–144, 1979.
- RITCHIE, K. B.; SMITH, G. W. Microbial Communities of Coral Surface Mucopolysaccharide Layers. **Coral Health and Disease**, p.259-264, 2013.
- RITCHIE, K. B. Bacterial symbionts of corals and Symbiodinium. **Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms**. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 139–150, 2012.
- ROUX, F.; WEGNER, K. M.; BAKER-AUSTIN, C.; VEZZULLI, L.; OSORIO, C.; R.; AMARO, C.; RITCHIE, JENNIFER M.; DEFOIRD, T.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; BLOKESCH, M.; MAZEL, D.; JACQ, A.; CAVA, F.; GRAM, LL.; WENDLING, C. C.; STRAUCH, E.; KIRSCHNER, AL.; HUEHN, S. The Emergence of Vibrio Pathogens in Europe: Ecology, Evolution, and Pathogenesis (Paris, 11-12th March 2015). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p. 830, 2015.
- OHWER, F.; YOULE, M. **Coral Reefs in the Microbial Sea**, United States, 1 ed, p. 758- 760, 2010.
- ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; AZAM, F.; KNOWLTON, N. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 1–10, 2002.
- ROSADO, P. M.; LEITE, D. C. A.; DUARTE, G. A. S.; CHALOUB, R. M.; JOSPIN, G.; NUNES R. U.; SARAIVA, J.; DINI-ANDREOTE, F.; EISEN, J. A.; BOURNE, D. G.; PEIXOTO, R. S. Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. **ISME Journal**, v. 13, n. 4 , p. 921-936, 2018.
- ROSENBERG, E.; BEN-HAIM, Y. Microbial diseases of corals and global warming. **Environmental microbiology**, v. 4, n. 6, p. 318–326, 2002.
- ROSENBERG, E. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, p. 355, 2007.
- ROSENBERG, E. Coral microbiology. **Microbial Biotechnology**, v. 2, n. 2, p. 147–147, 2009.
- ROSENBERG, E.; ZILBER-ROSENBERG, I. . The Hologenome Concept. Benef. Microorg. Multicell. **Life Forms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 323–340.

ROUX, F.; WEGNER, K. M.; BAKER-AUSTIN, C.; VEZZULLI, L.; OSORIO, C. R.; AMARO, C.; RITCHIE, J. M.; DEFOIRDT, T.; DESTOUMIEUX-GARZÓN, D.; BLOKESCH, M.; MAZEL, D.; JACQ, A.; CAVA, F.; GRAM, L.; WENDLING, C. C.; STRAUCH, E.; KIRSCHNER, A.; HUEHN, S. The emergence of *Vibrio* pathogens in Europe: ecology, evolution, and pathogenesis (Paris, 11–12th March 2015). **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. 5, p.19703, 2015.

RUBIO-PORTILLO, Esther et al. Biogeographic differences in the microbiome and pathobiome of the coral *Cladocora caespitosa* in the Western Mediterranean Sea. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 22, 2018.

RUIZ-RAMOS, Dannise V.; FISHER, Charles R.; BAUMS, Iliana B. Stress response of the black coral *Leiopathes glaberrima* when exposed to sub-lethal amounts of crude oil and dispersant. **Elem Sci Anth**, v. 5, n. 0, p. 77, 2017.

SABOURIN, D. T; SILLIMAN, J. E; STRYCHAR, Kevin B. Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Contents of Coral and Surface Sediments off the South Texas Coast of the Gulf of Mexico. **International Journal of Biology**, v. 5, n. 1, 27. 2012.

SABOURIN, D. T; SILLIMAN, J. E; STRYCHAR, Kevin B Marine Bacterioplankton Can Increase Evaporation and Gas Transfer Bymetabolizing Insoluble Surfactants from the Air-Seawater Interface. **FEMS Microbiology Letters**. England, v. 5, n.1, 2000.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; PAES, J. E. S.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. **Bioremediation of mangroves impacted by petroleum. Water, Air, and Soil Pollution**. v. 216, n. 1-4, p. 329-350 , 2011

SANTOS. H. F.; DUARTE, G. A. S.; RACHID, C. T. C. C.; CHALOUB, R.M.; CALDERON, E. N.; MARANGONI, L. F. B.; BIANCHINI, A.; NUDI, A. H.; DO CARMO, F. L.; VAN ELSAS, J. D.; ROSADO, A. S.; CASTRO, C.; PEIXOTO, R. S. Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1 p. 18268, 2014.

SANTOS, H. F.; CARMO, F. L.; MARTIREZ, N.; DUARTE, G. A. S.; CALDERON, E. N.; CASTRO, C. B.; PIRES, D. O.; ROSADO, A. S.; PEIXOTO, R. S. Cyanobacterial and microeukaryotic profiles of healthy, diseased, and dead *Millepora alcicornis* from the South Atlantic. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 119, n. 2, p. 163–172, 2016.

SAKAI, K. Effect of Colony Size, Polyp Size, and Budding Mode on Egg Production in a Colonial Coral. **The Biological Bulletin**, v. 195, n. 3, p. 319–325, 1998.

SCHLOSS, P. D.; WESTCOTT, S. L.; RYABIN, T.; HALL, J. R.; HARTMANN, M.; HOLLISTER, E. B.; LESNIEWSKI, R. A.; OAKLEY, B. B.; PARKS, D. H.; ROBINSON, C.

J.; SAHL, J. W.; STRES, B.; THALLINGER, G. G.; VAN HORN, D. J.; WEBER, C. F. Introducing mothur: Open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 75, n. 23, p. 7537-7541, 2009.

SHARON, G; ROSENBERG, E. Bacterial growth on coral mucus. **Current Microbiology**, v. 56, n.5 ,pp 481–488, 2008

SHASHAR, N.; COHEN, Y.; LOYA, Y. Extreme Diel Fluctuations of Oxygen in Diffusive Boundary Layers Surrounding Stony Corals. **The Biological Bulletin**, v. 185, n. 3, p. 455–461, 1993.

SHORS, E. C. Coralline bone graft substitutes. **Orthopedic Clinics of North America**, v. 30, n. 4, p. 599–613, 1999.

SILVA, D. P.; DUARTE, G.; VILLELA, H. D.M.; SANTOS, H. F.; ROSADO, P. M.; ROSADO, J. G.; ROSADO, A. S.; FERREIRA, E. M.; SORIANO, A. U.; PEIXOTO, R. S. Adaptable mesocosm facility to study oil spills impacts on corals. **Ecology and Evolution**, v. 9, n. 9, p. 5172–5175, 2019.

SOARES, M. O.; LOTUFO, T. M. C.; VIEIRA, L. M.; SALANI, S.; HAJDU, E.; MATTHEWS-CASCON, H.; LEÃO, Z. M.A.N.; KIKUCHI, R. K. P. Brazilian marine animal forests: A new world to discover in the Southwestern Atlantic. **Marine Animal Forests: The Ecology of Benthic Biodiversity Hotspots**, p. 73-110, 2017.

SWAN, H. B.; JONES, G. B.; DESCHASEAUX, E. S.M.; EYRE, B. D. Coral reef origins of atmospheric dimethylsulfide at Heron Island, southern Great Barrier Reef, Australia. **Biogeosciences**, v. 14, n. 1, p. 229-239, 2017.

TANNER, J. E. Seasonality and lunar periodicity in the reproduction of Pocilloporid corals. **Coral Reefs**, v. 15, n. 1, p. 59–66, 1996.

TERRA, L.; COELHO, M. A. **Geografia geral e geografia do Brasil: o espaço natural e socioeconômico**: volume único. 1. ed. São Paulo: Moderna, 2005

THOMAS, S.; BURDETT, H.; TEMPERTON, B.; WICK, R.; SNELLING, D.; MCGRATH, J. W.;QUINN, J. P.; MUNN, C.; GILBERT, J. A. Evidence for phosphonate usage in the coral holobiont. **The ISME journal**, v. 4, n. 3, p. 459, 2010.

THOMPSON, J. R.; RIVERA, H. E.; CLOSEK, C. J.; MEDINA, M. Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. **Environmental Microbiology**, v. 7, n. 7, p. 909–915, 2005.

THOMPSON, I. P.; VAN D. G.; CHRISTOPHER J.; CIRIC, L.; SINGER, A. C. Microbes in the coral holobiont: partners through evolution, development, and ecological interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 4, 2015.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US USA. Method 3510C: Separatory Funnel Liquid-Liquid Extraction. **Test Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods**, EPA Methods, 1996A.

US ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA. METHOD 8015B NONHALOGENATED ORGANICS USING GC/FID. **Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods**, EPA Methods, 1996b.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - US EPA. Method 8270D: Semivolatile **Methods for Evaluating Solid Waste, Physical/Chemical Methods**, EPA Methods, 2007.

VALAVI, H.; SAVARI, A.; YAVARI, V.; KOCHANIAN, P.; SAFAHIEH, A.; SEDIGHI S. O. Coral reef anthropogenic impact bio-indicators in the northern part of the Persian Gulf. **Applied Ecology and Environmental Research**, v. 5, n. 1, 2010.

VARJANI, S. J. Microbial degradation of petroleum hydrocarbons. **Bioresource Technology**, v. 223, p. 277–286, 2017.

VENOSA, A. D.; HOLDER, E. L. Biodegradability of dispersed crude oil at two different temperatures. **Marine Pollution Bulletin**, v. 54 n. 5, p. 545–553, 2007.

VERBRUGGEN, H.; TRIBOLLET, Al.. Boring algae. **Current Biology**, v. 21, n. 21, p. R876-R877, 2011.

VIEHMAN, S.; MILLS, D. K.; MEICHEL, G. W.; RICHARDSON, L. L. Culture and Identification of *Desulfovibrio* Spp. from Corals Infected by Black Band Disease on Dominican and Florida Keys Reefs. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 69, n. 1, p. 119–127, 2006.

VILLA, F. A.; GERWICK, L. Marine natural product drug discovery: Leads for treatment of inflammation, cancer, infections, and neurological disorders. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 32, n. 2, p. 228–237, 2010

WANG, L.; SHANTZ, A. A.; PAYET, J. P.; SHARPTON, T. J.; FOSTER, A.; BURKEPILE, D. E.; VEGA THURBER, R. Corals and Their Microbiomes Are Differentially Affected by Exposure to Elevated Nutrients and a Natural Thermal Anomaly. **Frontiers in Marine Science**, v. 5, p.101, 2018

WEBER, M. X.; MEDINA, M. The Role of Microalgal Symbionts (Symbiodinium) in Holobiont Physiology. **Advances in Botanical Research**, p. 119–140, 2012.

WEST, J. M.; SALM, R. V. Resistance and Resilience to Coral Bleaching: Implications for Coral Reef Conservation and Management. **Conservation Biology**, v. 17, n. 4, p. 956–967, 2003.

WHITE, H. K.; HSING, P. Y.; CHO, W.; SHANK, T. M.; CORDES, E. E.; QUATTRINI, A.

M.; NELSON, R. ; .CAMILLI, R.; DEMOPOULOS, A. W. J.; GERMAN, C. R.; BROOKS, J. M.; ROBERTS, H. H.; SHEDD, W.; REDDY, C. M.; FISHER, C. R. Impact of the Deepwater Horizon oil spill on a deep-water coral community in the Gulf of Mexico. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 50, p. 20303–20308, 2012.

WHITE, T. J.; BRUNS, T.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA Genes for phylogenetics. **PCR Protocols**, p. 315–322, 1990

XU, Y.; LU, M. Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. **Journal of Hazardous Materials**, v. 183, n. 1-3, p.395-401, 2010.

YENDER, R. A.; MICHEL, J.. Oil Toxicity to Corals. **Oil Spills in Coral Reefs**, p. 24–33, 2010.

ZILBERBERG, C.; ABRANTES, D. P.; MARQUES, J. A.; MACHADO, L. F.; MARANGONI, L. F. B. **Conhecendo os recifes brasileiros**: Rede de pesquisas coral vivo, Museu Nacional, UFRJ, rio de janeiro, 360 p, 2016.

ZILBERBERG, C.; WIRTZ, P. Fire ! The spread of the Caribbean fire coral *Millepora alcicornis* in the Eastern Atlantic. Preprint – bioRxiv 519041, 2019.

ANEXO 1

Figuras e tabelas suplementares

Supplementary Information for:

Multi-domain probiotic consortium as an alternative to chemical remediation of oil spill in coral reefs in a changing world

Denise P. da Silva.¹⁺, Helena D.M Villela.¹⁺, Henrique F. dos Santos³, Gustavo A. S. Duarte^{1,2}, José Roberto Ribeiro¹, Angela Michelato¹, Caren L.S. Vilela¹, Phillipe M. Rosado¹; Carolline S. Fazolato B.¹; Erika P. Santoro¹, Flavia L. Carmo¹ Dalton S. Ximenes⁴, Adriana U. Soriano⁴, Caio T. C.C. Rachid.⁵, Rebecca L. Vega Thurber^{6*},
Raquel S. Peixoto^{1, 2, 7*}

Materials and Methods

The supplementary materials are divided in two parts: **Part I** contains the development of the specific media to select oil-degrading multi-domain microbial consortium and **Part II** describes coral collection for experimental exposure and 16S rRNA gene sequencing *library preparation* methods.

Part I:

Media preparation

To develop of an oil-degrading multi-domain microbial consortium we first prepared selective media. Crude oil was added in 500 mL of sterile saline solution (0.85%), to a final concentration of 2%. The mixture was placed in a 2 L culture flask under constant agitation of 180 rpm at 24 °C for 48 h. Oil water soluble and insoluble fractions (oWSF and oWIF, respectively) were separated using a pump and a sterile 25 mL pipette. For

bacterial isolation, BH agar medium (Bushnell-Haas)(Sigma- Aldrich, Missouri USA) was supplemented with oWSF or oWIF, independently, as the only carbon source. In addition, two salinity concentrations were used in these media: 2.5 % and 8 % NaCl. A total of 4 types of media were used: BH-oWSF 2.5 % NaCl, BH-oWSF 8 % NaCl, BH-oWIF 2.5 % NaCl and BH-oWIF 8 % NaCl. Media for filamentous fungi isolation was BH broth (Sigma-Aldrich) supplemented with glucose 0.1 % and yeast extract 0.05 % (BH-G). oWSF and oWIF at concentration of 10% were filtered and each membrane was added to BH-G to select the strains able to grow in the presence of oil. All four BH agar media used for bacterial isolation and one supplemented with malt extract 2 % were used for spreading plates. All eight types of isolation media for fungi contained amoxicillin 0.05 % and chloramphenicol 0.04 %. The MS medium (malt extract 2 %, agar 2 %, NaCl 2.5 %) and MS broth were used to cultivate yeasts and filamentous fungi strains.

Oil -degrading consortium identification

Selected bacterial strains were submitted to genomic DNA extraction followed by PCR amplification. Two milliliters of each strain were grown in MB medium (Marine Broth 2216, Himedia Laboratories, Mumbai, India), and genomic DNA was extracted with the Wizard Genomic DNA Purification kit (Promega, California, USA). Primers 27f (5'AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3') and 1492r (5' GTTTACCTTGTTACGACTT 3') [33] were used for amplification of the 16S rRNA gene. PCR was performed in a final volume of 50 μ L, using 5 μ L of buffer (10X), 2 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 5 mM of each primer, 10 ng of genomic DNA and 2.5 U of Taq DNA polymerase (Promega, USA). The thermal cycling steps were a first denaturation cycle at 94 °C for 4 min; 35 cycles at 94 °C for 1 min followed by a 50 °C for 1 min and 72 °C for 2.5 min; a final extension cycle for 10 min

at 72 °C.

For filamentous fungi and yeast DNA extraction and PCR, a loop of biomass of each strain was used for extraction [92]. We evaluated the D1/D2 regions of the subunit of the 28S ribosomal RNA gene and the internal transcribed spacer (ITS) region. Primers for filamentous fungi, were: ITS1 (5' TCCGTAGGTGAACCTGCGG 3') and ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3') [34], and ITS+D1D2/LSU for yeast, using ITS1 and NL4 (5' GGTCCGTGTTTCAAGACGG 3') [35]. Amplification reactions followed the same protocol used for bacteria, but the thermal cycling conditions were: first step of denaturation at 94° C, followed by 30 cycles of 94 °C for 30 s, 52 °C for 30 s and 72 °C for 1 min, and a final step of 72 °C for 5 min.

Amplicon integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis, and gel purified from using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit according to the manufacture recommendations (GE Healthcare, Illinois, USA). Quantification of purified PCR products was performed using a Qubit® 2.0 Fluorometer dsDNA type fluorometer (Invitrogen, USA). Amplicons were sequenced (Macrogen Inc., Seoul, South Korea), with [92] the primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3'), 1492r (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3'), 532f (5'-CGT GCC AGC AGC CGC GGT AA-3') and 907r (5'-CCG TCA ATT CMT TTG AGT TT-3') [36] for bacteria strains, ITS1 and ITS4 for filamentous fungi and ITS1, ITS4, NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3') and NL4 for yeast strains. Low-quality sequences were removed after processing with the Ribosomal Database Project Sanger Pipeline (RDP; <http://pyro.cme.msu.edu>), and further assembled into contigs with the program Bioedit 7.0.5.355.

Part II:

Experimental design

Collection of experimental corals

Four individual colonies of the hydrocoral *Millepora alcicornis* were collected in different sampling sites at João Fernandes Beach, Armação dos Búzios, Rio de Janeiro, Brazil (22°44'29.95"S; 41°52'35.62"W) [37]. During transport, the fragments were kept submerged in renewed seawater, under shade cloth with a blocking capacity of 70 % of the solar incidence, and at the same water temperature as the collection site. The four genotypes of the sampled *M. alcicornis* were fragmented into nubbins of approximately 5 cm in length and 6 g of mass, glued on tiles with a drop of cyanoacrylate (Super Bonder Glue 3, Loctite, São Paulo, Brazil), and placed in aquariums. To guarantee the validation of random effect, one coral nubbin from each one of the four genotypes collected were placed in same aquariums.

Bacterial community associated with the hydrocoral *M. alcicornis*

Sample processing and total DNA extraction

To evaluate the diversity of the microbial communities associated with *M. alcicornis* hydrocoral under the impact of different remediation strategies, 0.5 g of coral fragment of each replicate was macerated with mortar and pestle using liquid nitrogen. Total DNA extraction from the coral was performed using the Qiagen DNAeasy Power Soil kit (Qiagen, Hilden, Germany). following the manufacturer's protocol. The extracted DNA was quantified by fluorimetry, with Qubit® 2.0 Fluorometer dsDNA type fluorometer (Invitrogen, California, USA).

High throughput sequencing and library preparation for 16S rRNA gene amplicon analysis

Bacterial communities were analyzed by sequencing the V4 variable region of the 16S rRNA gene. Single-step PCR was performed with primers 515F (5' GTGCCAGCMGCCGCGGTAA 3') and 806R (5' GGACTACHVGGGTWTCTAAT 3') [44] using AccuStart ToughMix II (Quanta BioSciences, Gaithersburg, Maryland, USA). Amplification occurred under the conditions: 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles of 94 °C for 45 s, 50 °C for 60 s and 72 °C for 90 s, followed by the final elongation step at 72 °C for 10 min. After PCR amplification, samples were purified by the Agencourt Ampure XP protocol (Roche Molecular Systems, California, USA) following the manufacturer's protocol. The multiplexed libraries were submitted to the Center for Genome Research and Biotechnology (CGRB) at Oregon State University, Corvallis - Oregon USA - for sequencing on the Illumina MiSeq platform.

Bioinformatics Analysis

The raw data were analyzed using Mothur version.1.39.5. After checking for barcodes and primers in the forward and reverse sequences, data were paired and merged into contigs after verification. Contigs of less than 290 base pairs (bp) and greater than 352 bp, with no ambiguity and containing more than 8 homopolymers, were removed. The sequences were aligned using the SILVA database as a reference. *Screen-seqs* (Mothur version.1.39.5) were performed to remove poorly aligned sequences and *filter-seqs* to remove columns without sequence information. These sequences were pre-clustered using the *pre.cluster* command to reduce noise allowing up to two differences between the sequences with the parameter *difs* = 2. To improve the quality of the sequences the chimeras were detected and eliminated through the *chimera.vsearch* and *remove.seqs* commands. Sequences were sorted with the *classify.seqs* command using

the Ribosomal Database Project (RDP) 16S rRNA version 16 as a reference and with a bootstrap value of 80. All chloroplast, mitochondria, Eukarya, and Archaea sequence identifications were removed, and the sequences were grouped in Operative Taxonomic Units (OTUs) with dissimilarity of 3 %. All the samples were normalized to the same number of sequences (5371).

Supplementary results

Repeated Measures Analysis (Read in data and summarize)

```
options(scipen=999)
dat <- read.csv('./Dados - 2 rodada - all treatments.csv')
dat2 <- read.csv('./Fv_Fm - 2 rodada - all treatments - 20190424.csv')# Remove observations
datdat$Treatments == 'oWSF+pBMC-BC' & dat$ID == 'P', 4:length(dat)]
<- NA
dat2[dat2$Treatments == 'oWSF+pBMC-BC' & dat2$ID == 'P', ] <- NA

#Make Time a categorical variable
#Fv_Fm was measured more often than the other parameters
dat$Time <- as.factor(dat$Time)
dat2$Time <- as.factor(dat2$Days)
summary(dat)
```

##	Treatments	ID	Time	Salinity
## Control	:12	A	: 3	0:32
## Corexit 9500	:12	AA	: 3	1:32
## oWSF	:12	B	: 3	2:32
## oWSF+Corexit 9500	:12	BB	: 3	
## oWSF+pBMC-BC	:12	C	: 3	
## oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	:12	CC	: 3	
## (Other)	:24	(Other)	:78	

##	pH	Ammonium	Nitrate	Phosphate
## Min.	:7.800	Min. : 11.10	Min. : 0.00	Min. : 0.00
## 1st Qu.	:8.040	1st Qu.: 28.10	1st Qu.: 0.00	1st Qu.: 9.00
## Median	:8.220	Median : 40.50	Median : 0.00	Median : 26.31
## Mean	:8.257	Mean : 96.51	Mean : 33.09	Mean : 50.03
## 3rd Qu.	:8.490	3rd Qu.: 93.40	3rd Qu.: 41.10	3rd Qu.: 58.50
## Max.	:8.800	Max. : 532.20	Max. : 358.60	Max. : 391.00

```
## NA's :3      NA's :3      NA's :3      NA's :3
##          DOC          TPH          PAH
## Min.    : 0.00    Min.    : 0.00    Min.    : 0.000
## 1st Qu.: 35.21    1st Qu.: 0.00    1st Qu.: 0.148
## Median  : 77.35    Median   : 50.17   Median   : 1.843
## Mean    : 134.43   Mean     : 3278.31  Mean     : 693.816
## 3rd Qu.: 182.00   3rd Qu.: 2957.00  3rd Qu.: 53.666
## Max.    :1035.00   Max.     :49110.00  Max.     :8045.189
## NA's    :3        NA's     :3        NA's     :3
summary(dat2)
##          Treatments      ID      Days
## Control                :20  A      : 5  Min.    : 1.0
## Corexit 9500            :20  AA     : 5  1st Qu.: 4.0
## oWSF                    :20  B      : 5  Median  : 7.0
## oWSF+Corexit 9500       :20  BB     : 5  Mean    : 6.8
## oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500:20  C      : 5  3rd Qu.: 9.0
## (Other)                 :55  (Other):130  Max.    :13.0
## NA's                    : 1  NA's   : 1  NA's    :1
##      Fv_Fm      Time
## Min.    :0.0000  1   :31
## 1st Qu.:0.0400  4   :31
## Median  :0.5370  7   :31
## Mean    :0.3643  9   :31
## 3rd Qu.:0.6072  13  :31
## Max.    :0.6530  NA's: 1
## NA's    :2
```

Repeated measures ANOVA

Fv/Fm

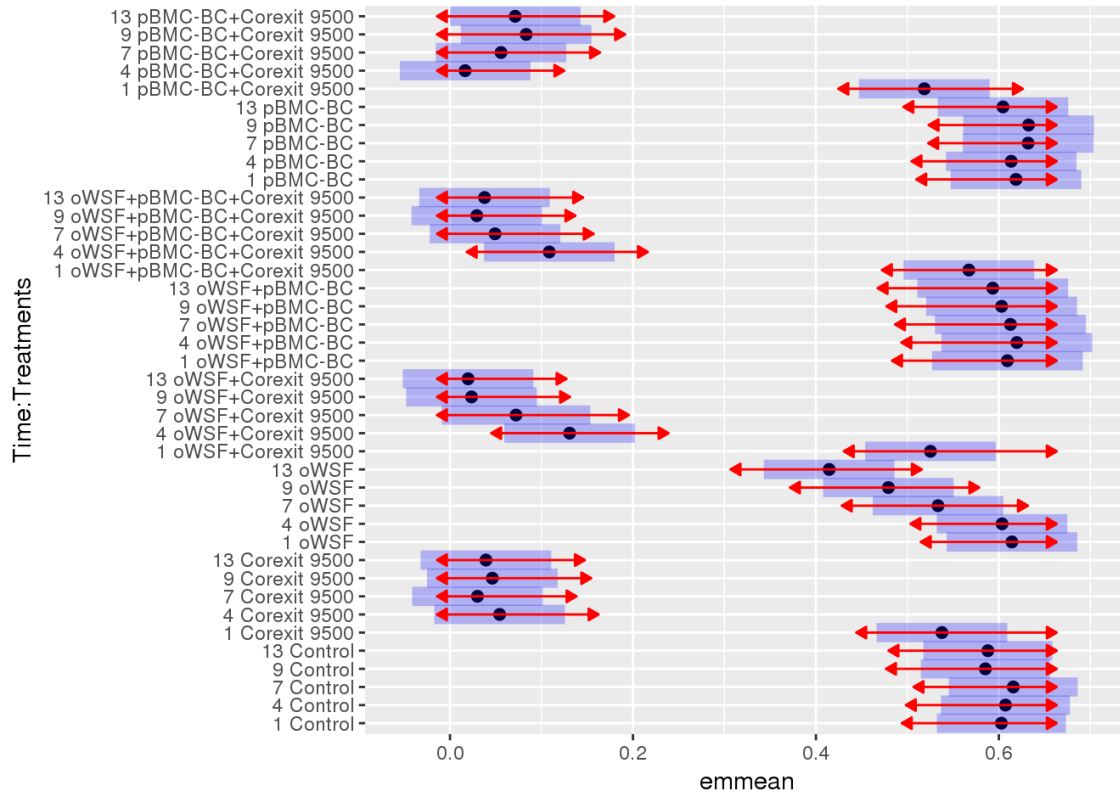
```
library(nlme)
library(emmeans)
library(DT);library(knitr)

#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(Fv_Fm ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat2,
na.action = na.omit)
anova(model)

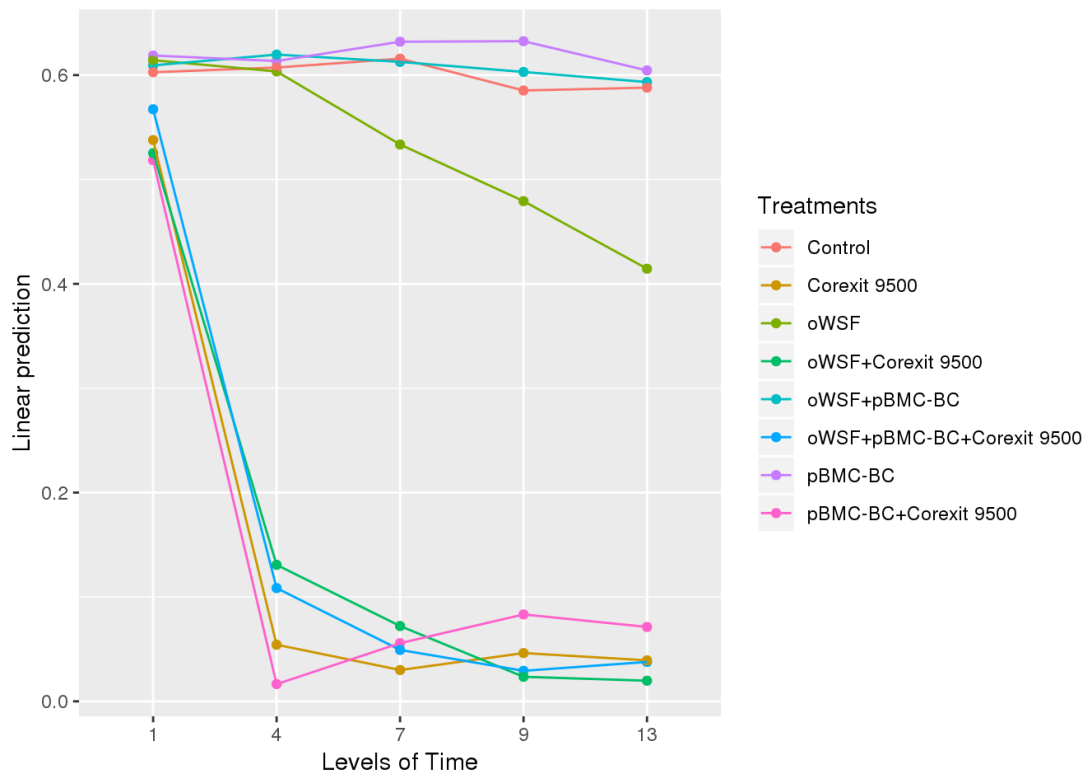
##          numDF denDF    F-value p-value
## (Intercept)      1    91 2299.6102 <.0001
## Time              4    91  116.9652 <.0001
## Treatments        7    23  119.9930 <.0001
## Time:Treatments   28    91   13.4514 <.0001

#summary(model)
marginal <- emmeans(model, pairwise ~ Time * Treatments)
```


plot (marginal, comparisons=T)



lsmip (model, Treatments~Time)



```
kable(CLD(marginal$emmeans), row.names = F)
```

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
4	pBMC-BC+Corexit 9500	0.0165000	0.0345117	23	-0.0548930	0.0878930	1
13	oWSF+Corexit 9500	0.0197500	0.0345117	23	-0.0516430	0.0911430	1
9	oWSF+Corexit 9500	0.0235000	0.0345117	23	-0.0478930	0.0948930	1
9	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	0.0292500	0.0345117	23	-0.0421430	0.1006430	1
7	Corexit 9500	0.0300000	0.0345117	23	-0.0413930	0.1013930	1
13	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	0.0377500	0.0345117	23	-0.0336430	0.1091430	1
13	Corexit 9500	0.0392500	0.0345117	23	-0.0321430	0.1106430	1
9	Corexit 9500	0.0462500	0.0345117	23	-0.0251430	0.1176430	1
7	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	0.0492500	0.0345117	23	-0.0221430	0.1206430	1
4	Corexit 9500	0.0542500	0.0345117	23	-0.0171430	0.1256430	1
7	pBMC-BC+Corexit 9500	0.0557500	0.0345117	23	-0.0156430	0.1271430	1
13	pBMC-BC+Corexit 9500	0.0712500	0.0345117	23	-0.0001430	0.1426430	1
7	oWSF+Corexit 9500	0.0721437	0.0392823	23	-0.0091179	0.1534053	1
9	pBMC-BC+Corexit 9500	0.0832500	0.0345117	23	0.0118570	0.1546430	1
4	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	0.1085000	0.0345117	23	0.0371070	0.1798930	1
4	oWSF+Corexit 9500	0.1307500	0.0345117	23	0.0593570	0.2021430	1

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
13	oWSF	0.4145000	0.0345117	23	0.3431070	0.4858930	2
9	oWSF	0.4792500	0.0345117	23	0.4078570	0.5506430	23
1	pBMC-BC+Corexit 9500	0.5185000	0.0345117	23	0.4471070	0.5898930	23
1	oWSF+Corexit 9500	0.5252500	0.0345117	23	0.4538570	0.5966430	23
7	oWSF	0.5335000	0.0345117	23	0.4621070	0.6048930	23
1	Corexit 9500	0.5377500	0.0345117	23	0.4663570	0.6091430	23
1	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	0.5672500	0.0345117	23	0.4958570	0.6386430	23
9	Control	0.5852500	0.0345117	30	0.5147676	0.6557324	23
13	Control	0.5880000	0.0345117	30	0.5175176	0.6584824	23
13	oWSF+pBMC-BC	0.5933333	0.0398507	23	0.5108959	0.6757708	23
1	Control	0.6027500	0.0345117	30	0.5322676	0.6732324	23
9	oWSF+pBMC-BC	0.6030000	0.0398507	23	0.5205625	0.6854375	23
4	oWSF	0.6035000	0.0345117	23	0.5321070	0.6748930	3
13	pBMC-BC	0.6045000	0.0345117	23	0.5331070	0.6758930	23
4	Control	0.6072500	0.0345117	30	0.5367676	0.6777324	23
1	oWSF+pBMC-BC	0.6093333	0.0398507	23	0.5268959	0.6917708	23
7	oWSF+pBMC-BC	0.6126667	0.0398507	23	0.5302292	0.6951041	23
4	pBMC-BC	0.6135000	0.0345117	23	0.5421070	0.6848930	23
1	oWSF	0.6142500	0.0345117	23	0.5428570	0.6856430	3
7	Control	0.6157500	0.0345117	30	0.5452676	0.6862324	23
1	pBMC-BC	0.6187500	0.0345117	23	0.5473570	0.6901430	23
4	oWSF+pBMC-BC	0.6196667	0.0398507	23	0.5372292	0.7021041	23
7	pBMC-BC	0.6320000	0.0345117	23	0.5606070	0.7033930	3
9	pBMC-BC	0.6325000	0.0345117	23	0.5611070	0.7038930	3

```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts), options = list(pageLength = 20))
```

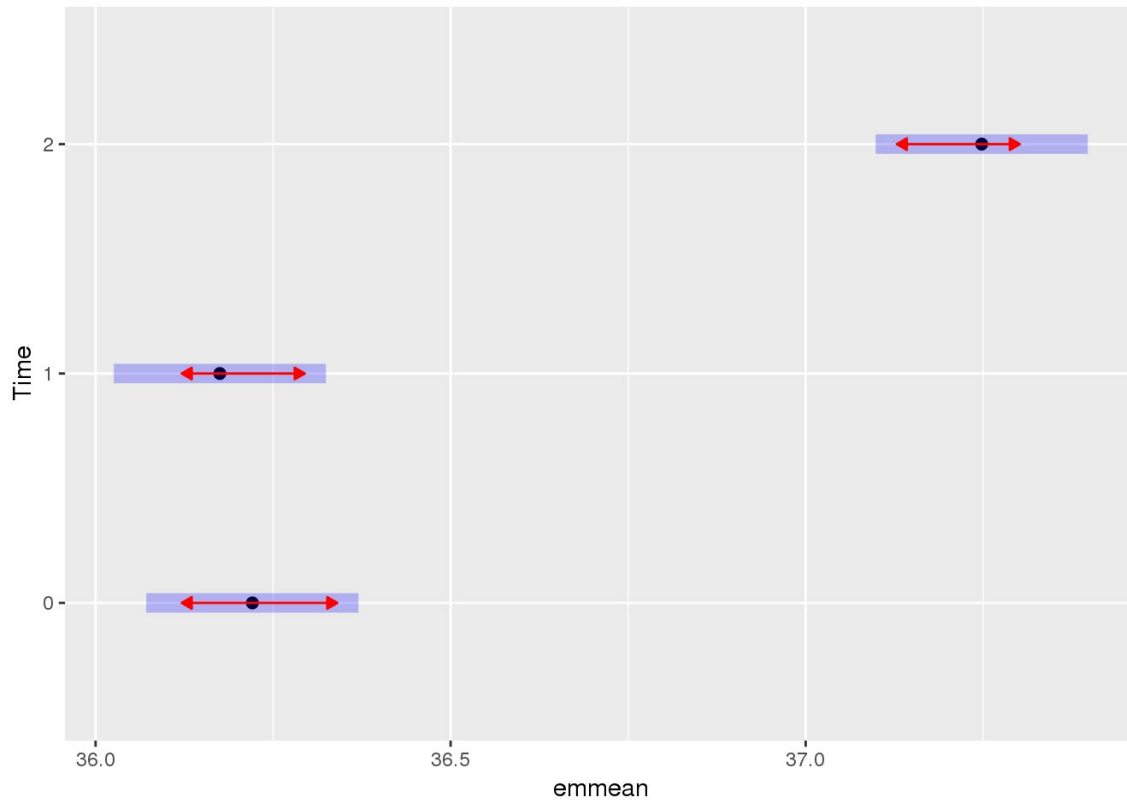
Salinity

```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(Salinity ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)

anova(model)
##          numDF denDF  F-value p-value
## (Intercept)          1    46 684499.1 <.0001
```

```
## Time          2    46    78.9 <.0001
## Treatments    7    23     2.8 0.0300
## Time:Treatments 14   46     1.6 0.1144
```

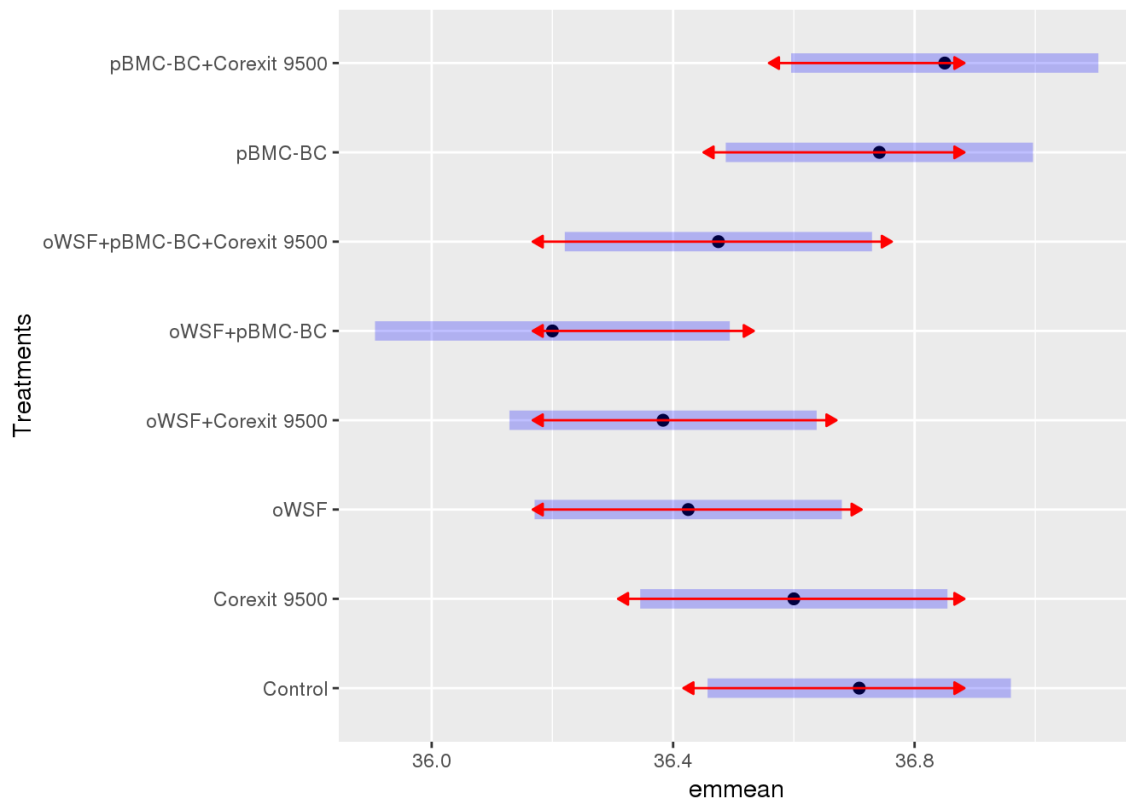
```
#summary(model)
Time <- emmeans(model, ~ Time)
plot (Time, comparisons = T)
```



```
kable(CLD(Time), row.names = F)
```

Time	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
1	36.17500	0.0722287	23	36.02558	36.32442	1
0	36.22083	0.0722287	23	36.07142	36.37025	1
2	37.24792	0.0722287	23	37.09850	37.39733	2

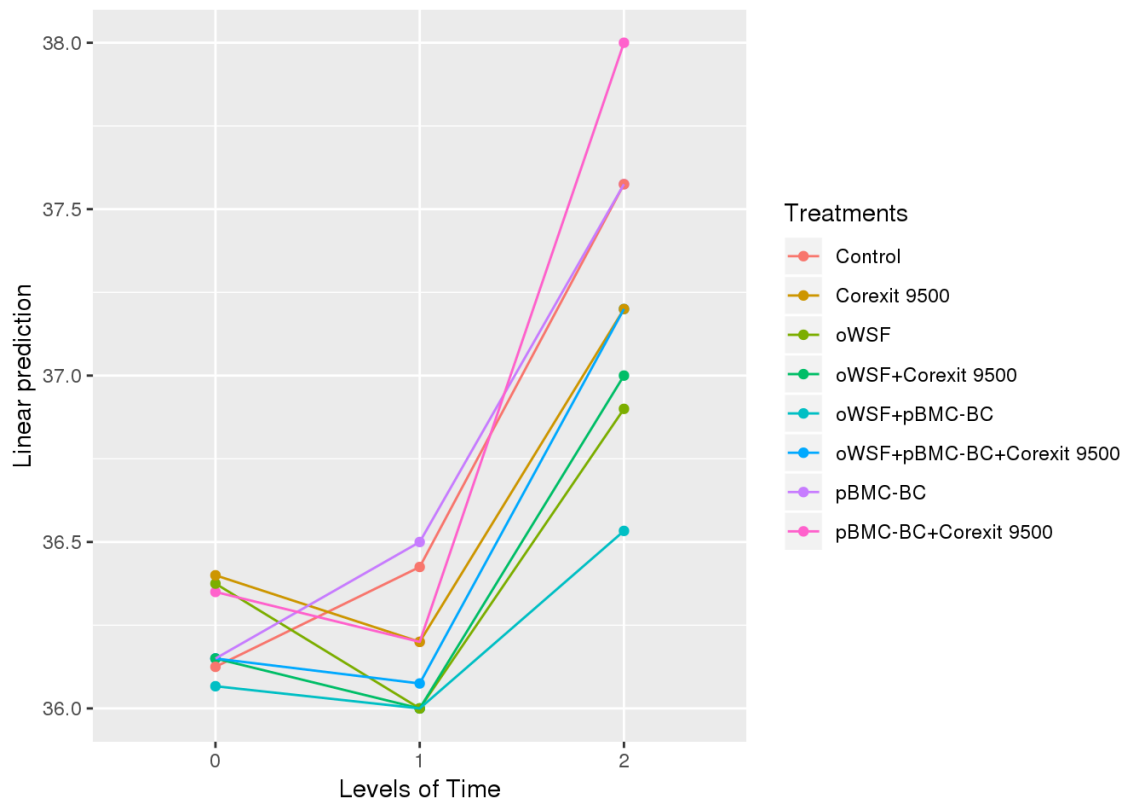
```
Treatments <- emmeans(model, ~ Treatments)
plot(Treatments, comparisons = T)
```



```
kable (CLD (Treatments), row.names = F)
```

Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
oWSF+pBMC-BC	36.20000	0.1420462	23	35.90615	36.49385	1
oWSF+Corexit 9500	36.38333	0.1230157	23	36.12886	36.63781	12
oWSF	36.42500	0.1230157	23	36.17052	36.67948	12
oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	36.47500	0.1230157	23	36.22052	36.72948	12
Corexit 9500	36.60000	0.1230157	23	36.34552	36.85448	12
Control	36.70833	0.1230157	30	36.45710	36.95956	12
pBMC-BC	36.74167	0.1230157	23	36.48719	36.99614	12
pBMC-BC+Corexit 9500	36.85000	0.1230157	23	36.59552	37.10448	2

```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



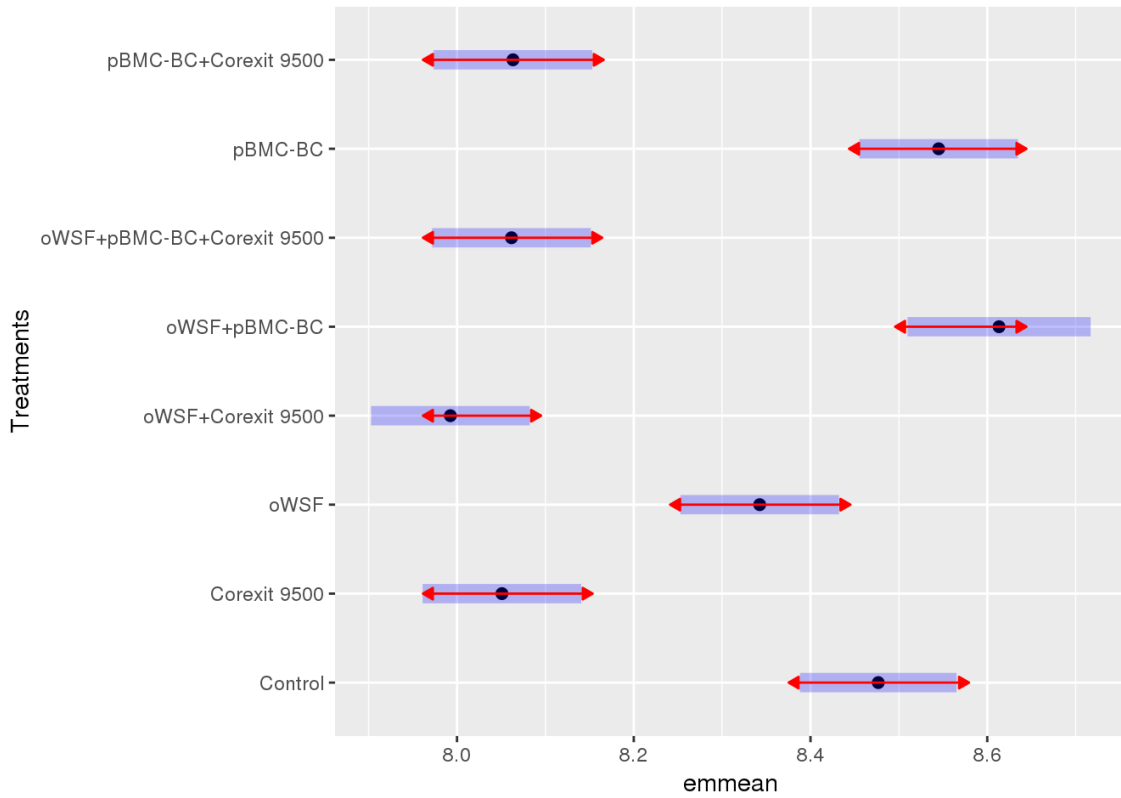
pH

```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(pH ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)
anova(model)
```

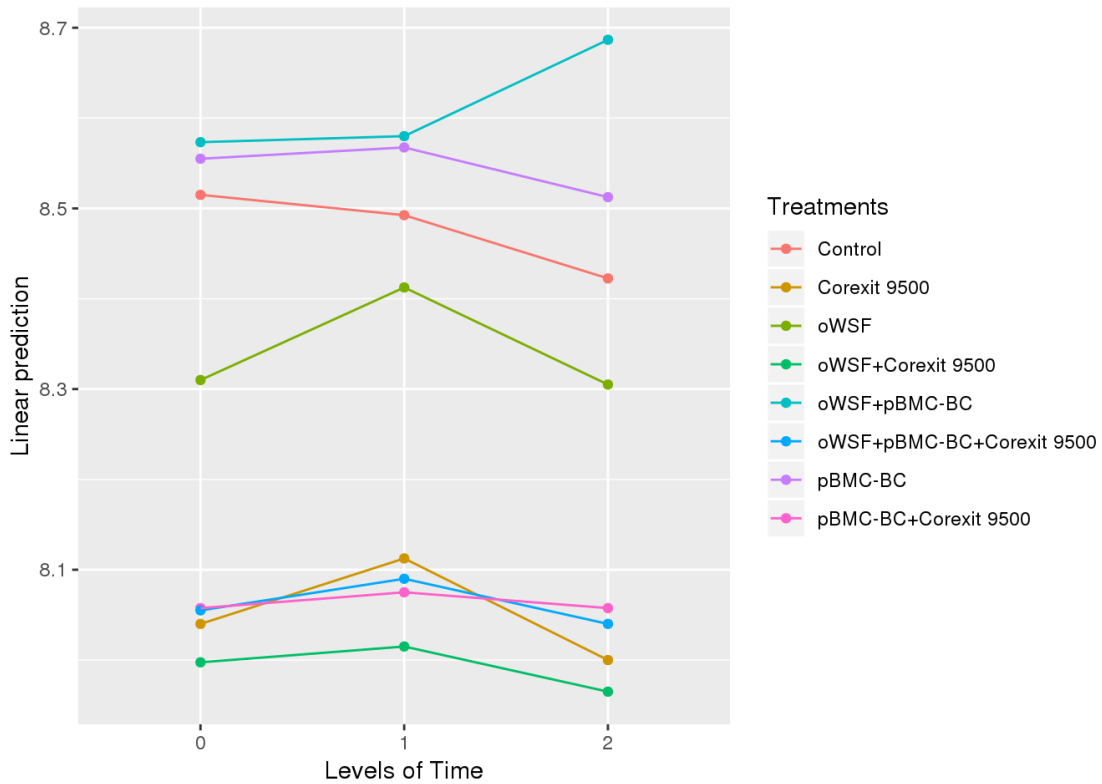
##	numDF	denDF	F-value	p-value
## (Intercept)	1	46	280773.82	<.0001
## Time	2	46	2.03	0.1426
## Treatments	7	23	32.02	<.0001
## Time:Treatments	14	46	0.58	0.8631

```
#summary(model)
```

```
marginal <- emmeans(model, ~ Treatments)
plot(marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal), row.names = F)
```

Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
oWSF+Corexit 9500	7.992500	0.0433810	23	7.902760	8.082240	1
Corexit 9500	8.050833	0.0433810	23	7.961093	8.140574	1
oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	8.061667	0.0433810	23	7.971926	8.151407	1
pBMC-BC+Corexit 9500	8.063333	0.0433810	23	7.973593	8.153074	1
oWSF	8.342500	0.0433810	23	8.252759	8.432241	2
Control	8.476667	0.0433810	30	8.388071	8.565263	23
pBMC-BC	8.545000	0.0433810	23	8.455260	8.634740	23
oWSF+pBMC-BC	8.613333	0.0500921	23	8.509710	8.716957	3

```
#DT::datatable(data.frame(marginal), options = list(pageLength = 20))
```

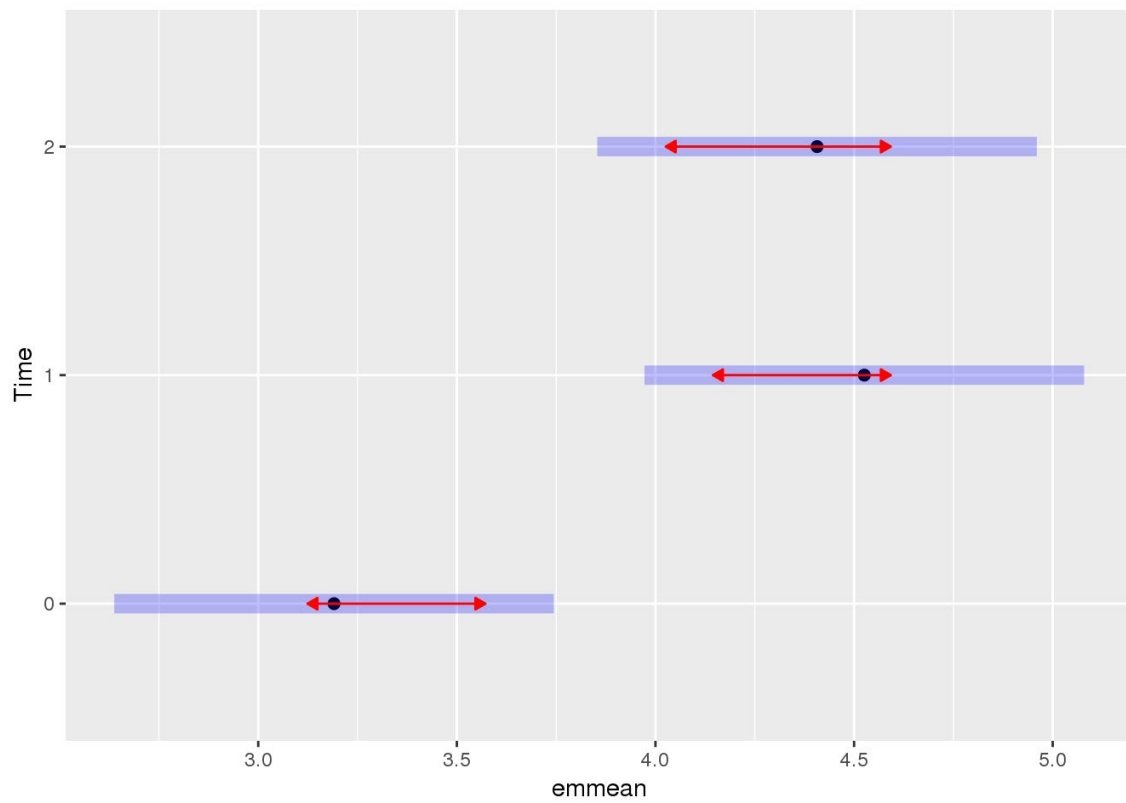
DOC

```
dat$DOC <- log(dat$DOC+1)
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(DOC ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)
anova(model)
```

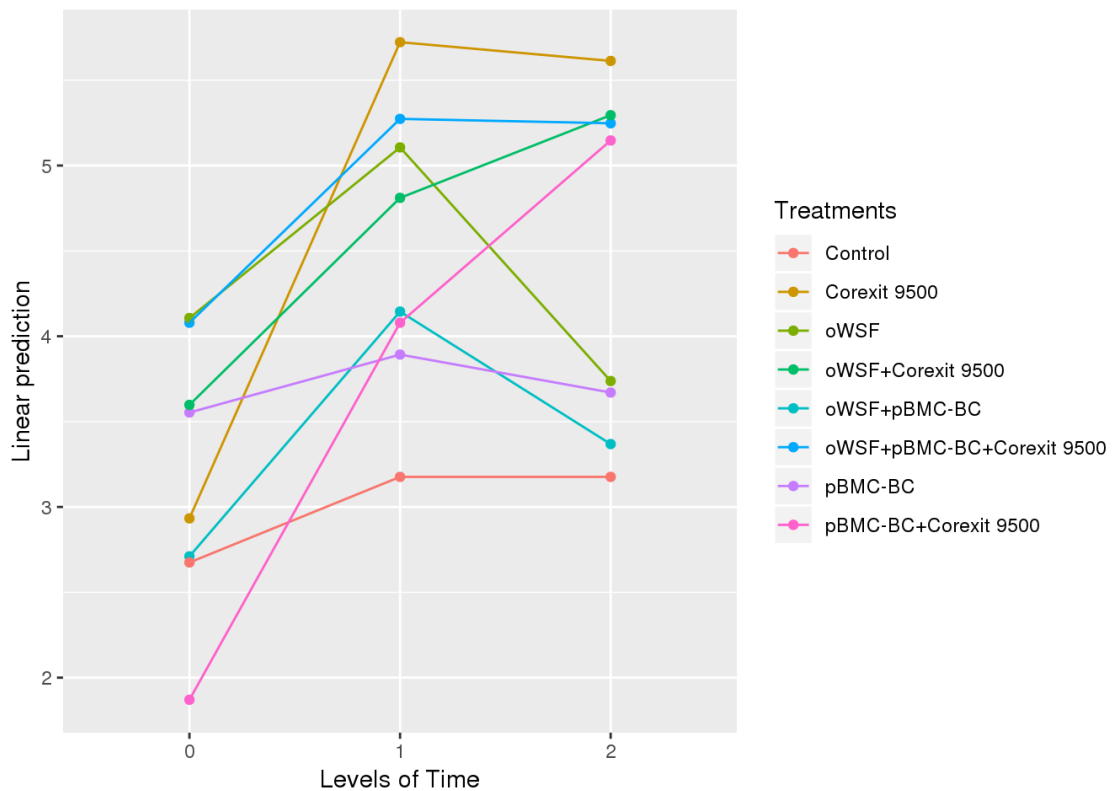
```
##          numDF denDF  F-value p-value
## (Intercept)      1    46 431.7891 <.0001
## Time            2    46  11.2364 0.0001
## Treatments      7    23   1.5146 0.2118
## Time:Treatments 14    46   1.2213 0.2933
```

```
#summary(model)
```

```
marginal <- emmeans(model, ~ Time)
plot(marginal, comparisons=T)
```

```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal), row.names = F)
```

Time	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
0	3.190768	0.2674706	23	2.637463	3.744073	1
2	4.406819	0.2674706	23	3.853514	4.960124	2
1	4.525680	0.2674706	23	3.972375	5.078985	2

```
#DT::datatable(data.frame(marginal), options = list(pageLength = 20))
```

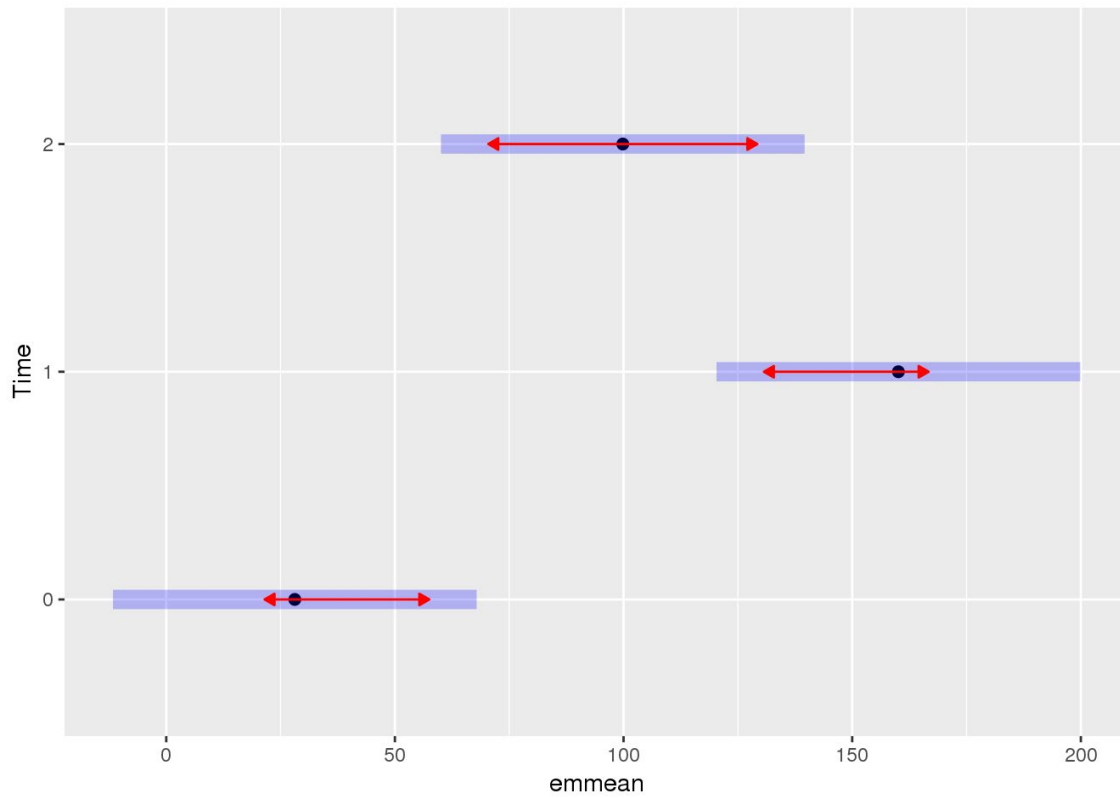
Ammonium

```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#include ID as a random effect
model <- lme(Ammonium ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)

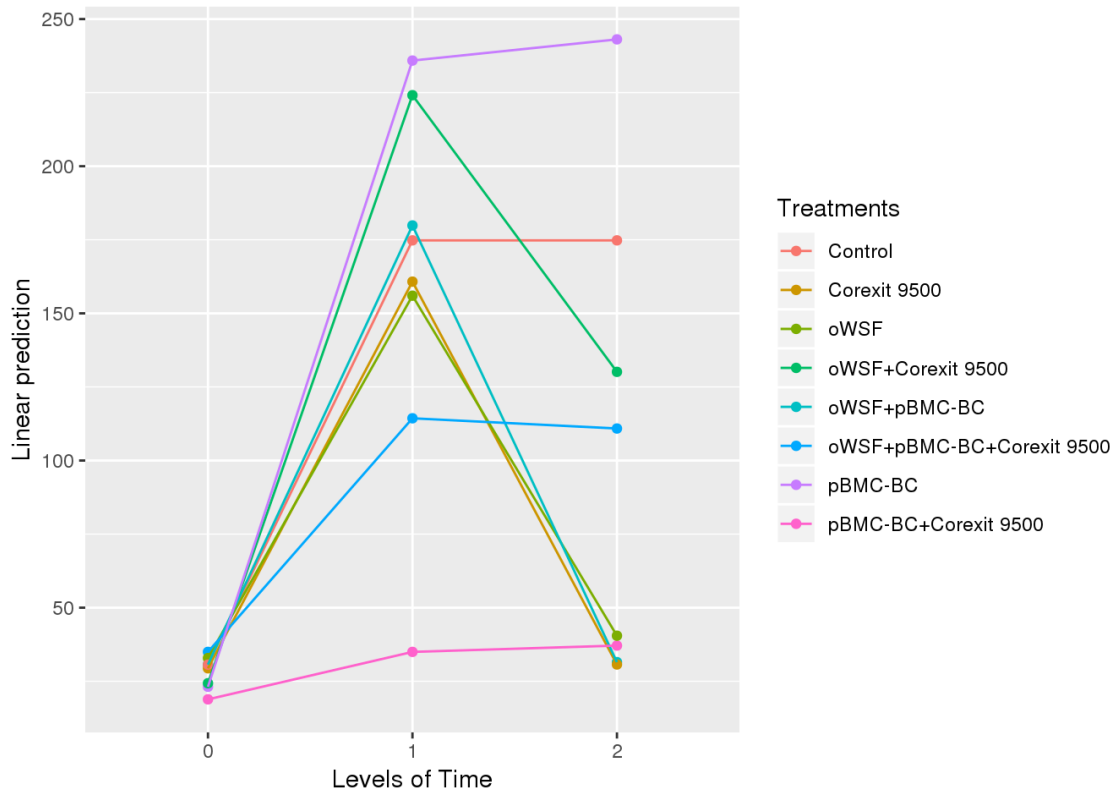
anova(model)
##
## numDF denDF F-value p-value
## (Intercept) 1 46 54.33377 <.0001
## Time 2 46 14.86190 <.0001
## Treatments 7 23 1.33429 0.2794
## Time:Treatments 14 46 1.07213 0.4060

#summary(model)
```

```
marginal <- emmeans(model, ~ Time)
plot (marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal), row.names = F)
```

Time	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
0	28.10833	19.22297	23	-11.65741	67.87408	1
2	99.83750	19.22297	23	60.07175	139.60325	2
1	160.09896	19.22297	23	120.33321	199.86470	3

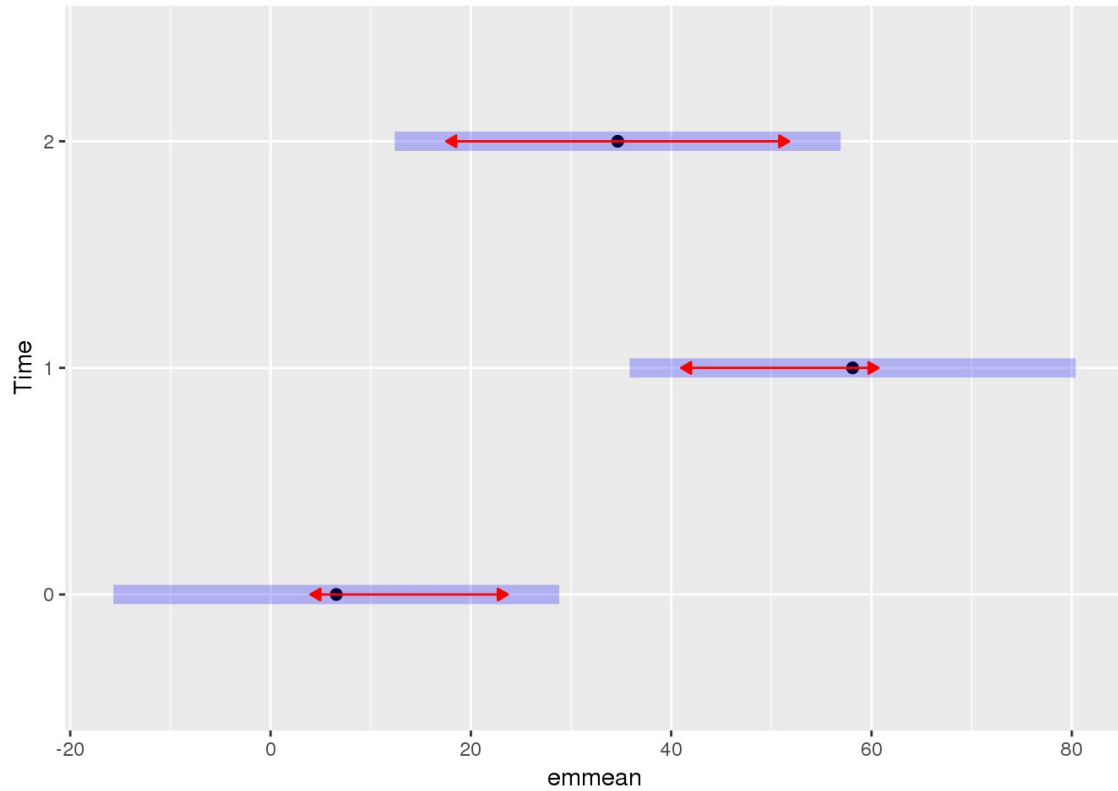
```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts), options = list(pageLength = 20))
```

Nitrate

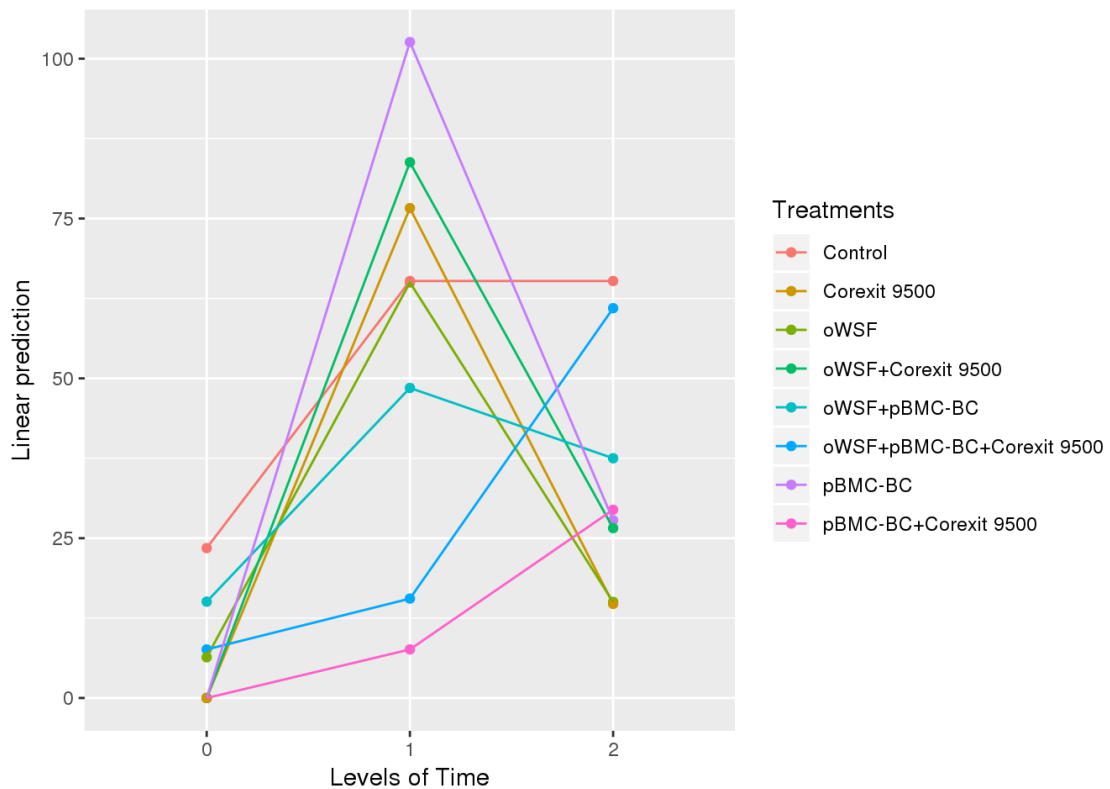
```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(Nitrate ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)
anova(model)
```

```
##
## numDF denDF F-value p-value
## (Intercept) 1 46 22.468590 <.0001
## Time 2 46 6.880828 0.0024
## Treatments 7 23 0.353333 0.9198
## Time:Treatments 14 46 0.723966 0.7396
```

```
#summary(model)
marginal <- emmeans(model, ~ Time)
plot(marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip(model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal), row.names = F)
```

Time	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	group
0	6.561458	10.76017	23	-15.69766	28.82057	1
2	34.659375	10.76017	23	12.40026	56.91849	12
1	58.112500	10.76017	23	35.85339	80.37161	2

```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts), options = list(pageLength = 20))
```

Phosphate

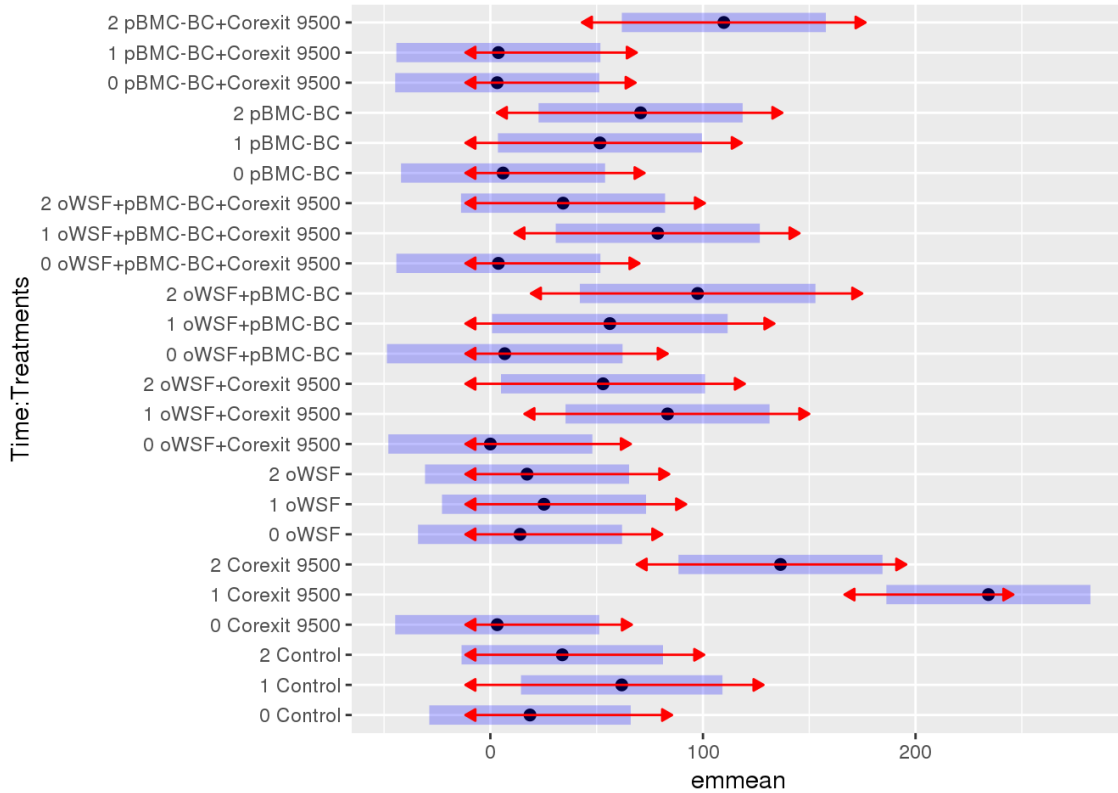
```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(Phosphate ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action
= na.omit)
anova(model)
```

```
##          numDF denDF  F-value p-value
## (Intercept)      1   46 108.13327 <.0001
## Time            2   46  20.20636 <.0001
```

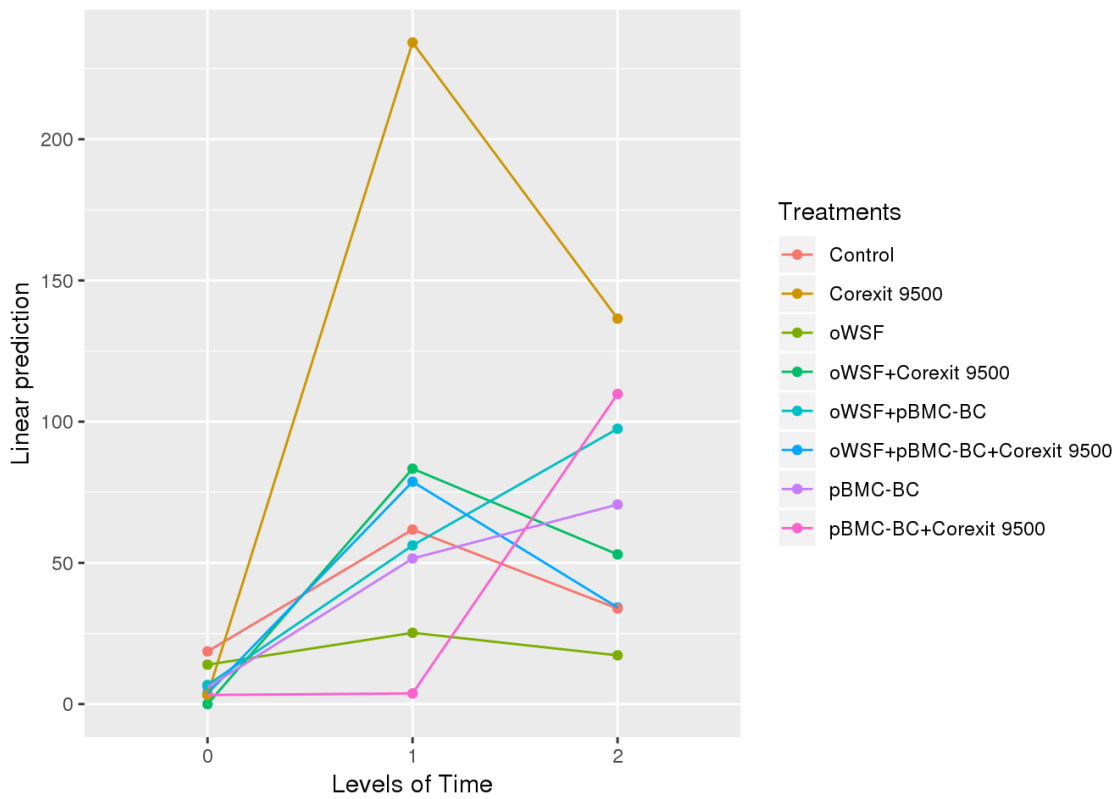
```
## Treatments      7    23   5.58713  0.0007
## Time:Treatments 14    46   3.37453  0.0009
```

```
#summary(model)
```

```
marginal <- emmeans(model, pairwise ~ Time * Treatments)
plot(marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip(model, Treatments~Time)
```



```
kable (CLD (marginal$emmeans), row.names = F)
```

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
0	oWSF+Corexit 9500	0.000000	23.19803	23	-47.9887806	47.98878	1
0	Corexit 9500	3.225000	23.19803	23	-44.7637806	51.21378	1
0	pBMC-BC+Corexit 9500	3.225000	23.19803	23	-44.7637806	51.21378	12
1	pBMC-BC+Corexit 9500	3.775000	23.19803	23	-44.2137806	51.76378	12
0	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	3.775000	23.19803	23	-44.2137806	51.76378	12
0	pBMC-BC	5.975000	23.19803	23	-42.0137806	53.96378	12
0	oWSF+pBMC-BC	6.766667	26.78678	23	-48.6460041	62.17934	12
0	oWSF	13.962500	23.19803	23	-34.0262806	61.95128	12
2	oWSF	17.260000	23.19803	23	-30.7287806	65.24878	12
0	Control	18.650000	23.19803	30	-28.7266970	66.02670	12
1	oWSF	25.245000	23.19803	23	-22.7437806	73.23378	12
2	Control	33.825000	23.19803	30	-13.5516970	81.20170	12

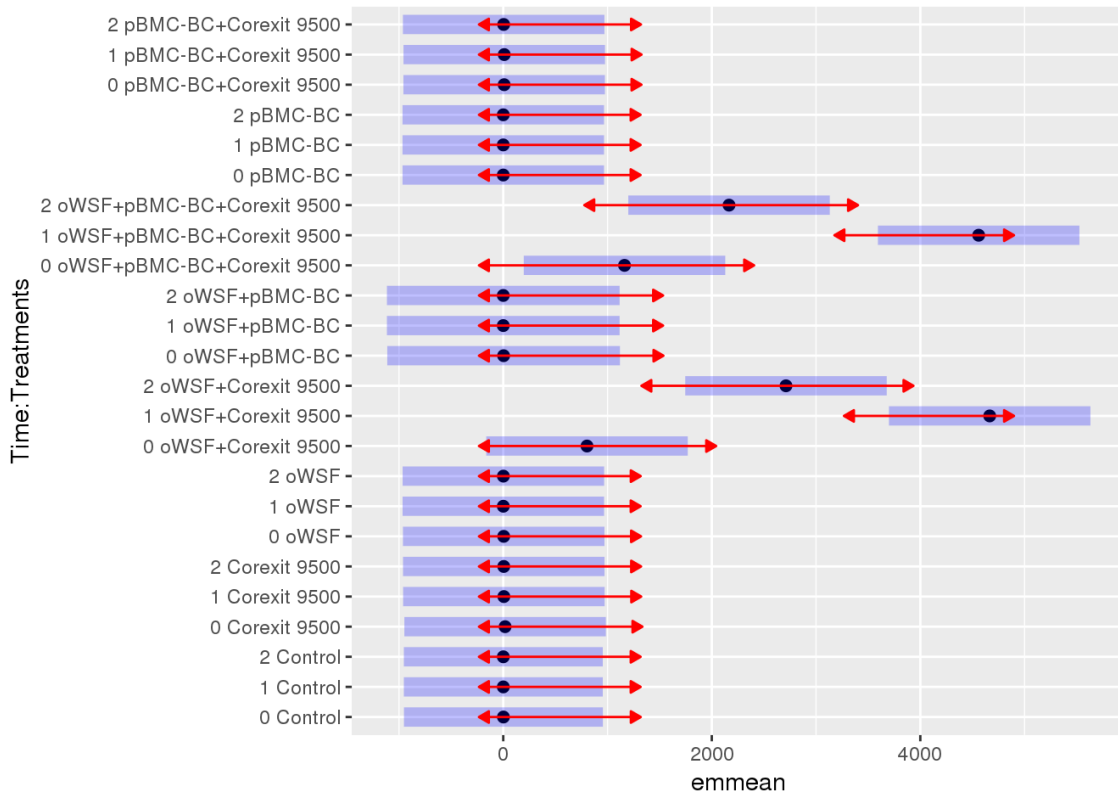
Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
2	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	34.200000	23.19803	23	-13.7887806	82.18878	12
1	pBMC-BC	51.550000	23.19803	23	3.5612194	99.53878	12
2	oWSF+Corexit 9500	53.000000	23.19803	23	5.0112194	100.98878	12
1	oWSF+pBMC-BC	56.200000	26.78678	23	0.7873292	111.61267	12
1	Control	61.800000	23.19803	30	14.4233030	109.17670	12
2	pBMC-BC	70.675000	23.19803	23	22.6862194	118.66378	12
1	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	78.750000	23.19803	23	30.7612194	126.73878	12
1	oWSF+Corexit 9500	83.350000	23.19803	23	35.3612194	131.33878	12
2	oWSF+pBMC-BC	97.500000	26.78678	23	42.0873292	152.91267	123
2	pBMC-BC+Corexit 9500	109.825000	23.19803	23	61.8362194	157.81378	123
2	Corexit 9500	136.475000	23.19803	23	88.4862194	184.46378	23
1	Corexit 9500	234.275000	23.19803	23	186.2862194	282.26378	3

```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts), options = list(pageLength = 20))
```

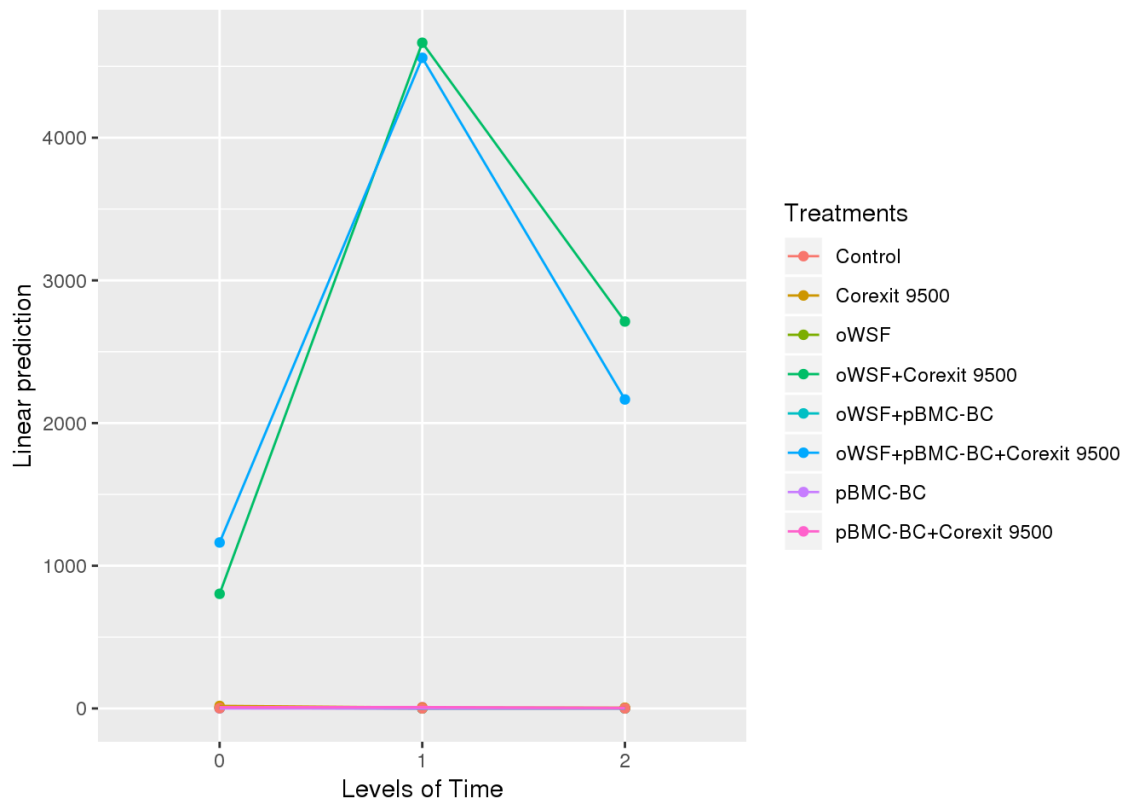
PAH

```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(PAH ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action =
na.omit)
anova(model)
##                numDF denDF  F-value p-value
## (Intercept)         1    46  51.30686 <.0001
## Time                2    46   7.85888  0.0012
## Treatments          7    23  20.86227 <.0001
## Time:Treatments    14    46   3.31448  0.0011
#summary(model)

marginal <- emmeans(model, pairwise ~ Time * Treatments)
plot(marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal$emmeans), row.names = F)
```

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
1	oWSF+pBMC-BC	0.0340000	539.3090	23	-1115.6117	1115.6797	12
1	pBMC-BC	0.0615000	467.0553	23	-966.1160	966.2390	1
0	pBMC-BC	0.0862500	467.0553	23	-966.0912	966.2637	1
2	pBMC-BC	0.1067500	467.0553	23	-966.0707	966.2842	1
2	oWSF+pBMC-BC	0.1413333	539.3090	23	-1115.5043	1115.7870	12
1	Control	0.4850000	467.0553	30	-953.3692	954.3392	1
2	Control	0.5837500	467.0553	30	-953.2704	954.4379	1
1	oWSF	0.6197500	467.0553	23	-965.5577	966.7972	1
2	oWSF	1.2617500	467.0553	23	-964.9157	967.4392	1
0	Control	1.6350000	467.0553	30	-952.2192	955.4892	1
0	oWSF+pBMC-BC	3.3910000	539.3090	23	-1112.2547	1119.0367	12
2	pBMC-BC+Corexit 9500	3.9465000	467.0553	23	-962.2310	970.1240	1

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
0	oWSF	4.3650000	467.0553	23	-961.8125	970.5425	1
2	Corexit 9500	4.9907500	467.0553	23	-961.1867	971.1682	1
1	Corexit 9500	5.9947500	467.0553	23	-960.1827	972.1722	1
0	pBMC-BC+Corexit 9500	8.6052500	467.0553	23	-957.5722	974.7827	12
1	pBMC-BC+Corexit 9500	9.3965000	467.0553	23	-956.7810	975.5740	12
0	Corexit 9500	17.7292500	467.0553	23	-948.4482	983.9067	12
0	oWSF+Corexit 9500	803.1927500	467.0553	23	-162.9847	1769.3702	12
0	oWSF+pBMC- BC+Corexit 9500	1162.9485000	467.0553	23	196.7710	2129.1260	12
2	oWSF+pBMC- BC+Corexit 9500	2165.5532500	467.0553	23	1199.3758	3131.7307	123
2	oWSF+Corexit 9500	2711.7595000	467.0553	23	1745.5820	3677.9370	23
1	oWSF+pBMC- BC+Corexit 9500	4559.7662500	467.0553	23	3593.5888	5525.9437	3
1	oWSF+Corexit 9500	4665.4685000	467.0553	23	3699.2910	5631.6460	3

```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts), options = list(pageLength = 20))
```

n-alkanes

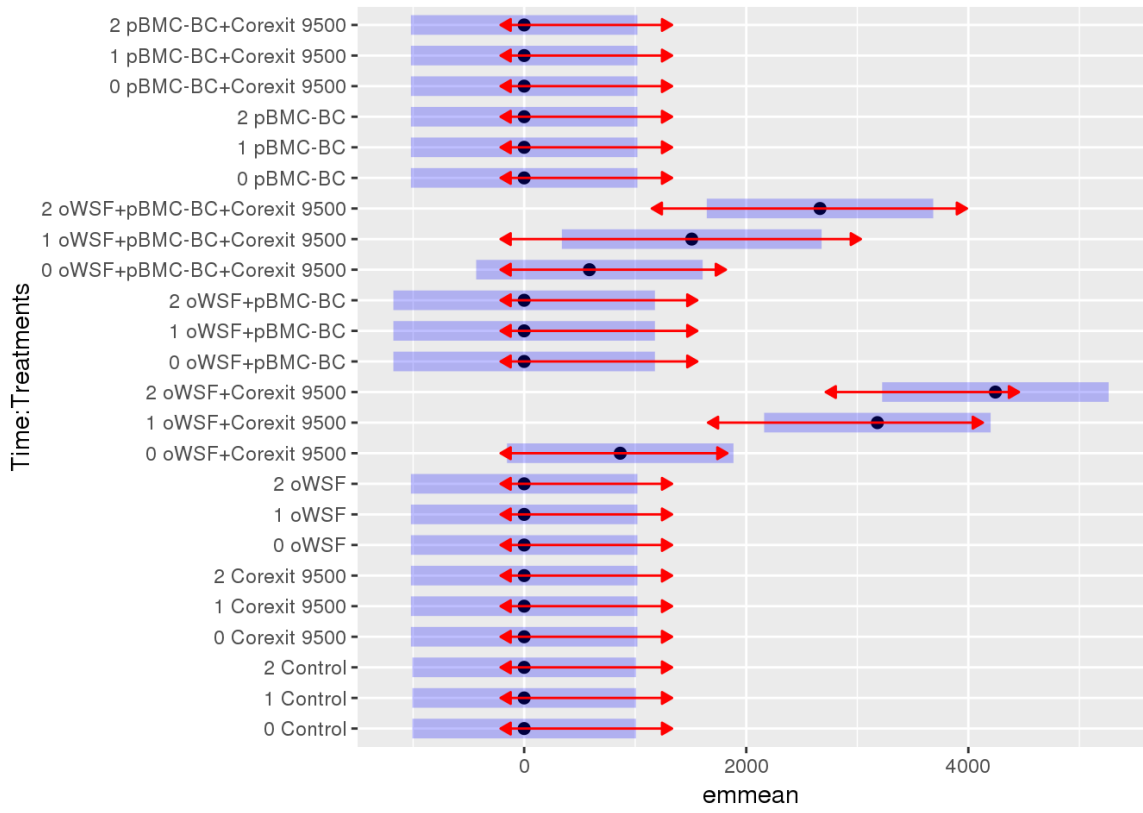
```
#Create model with Treatment, Time, Treatment and Time interaction
#Include ID as a random effect
model <- lme(n.alkanes ~ Time*Treatments, random = ~1|ID, data=dat, na.action
= na.omit)

anova(model)

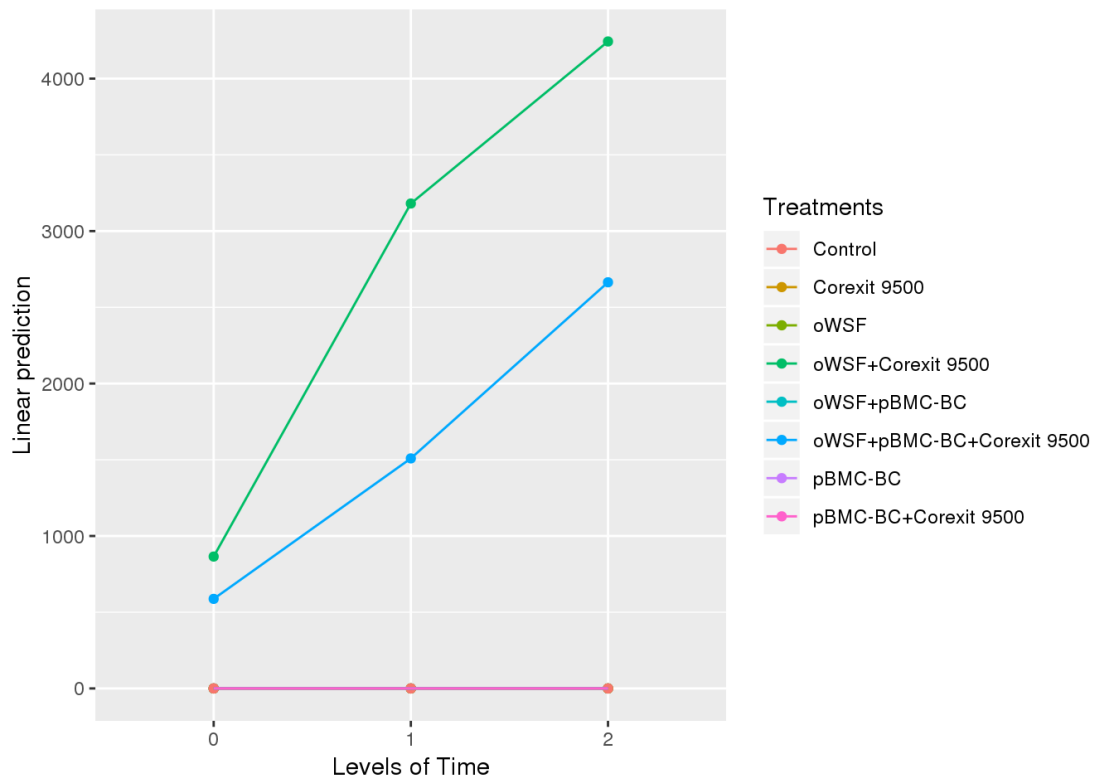
##              numDF denDF    F-value p-value
## (Intercept)         1    45 21.527474 <.0001
## Time                2    45  4.835038  0.0125
## Treatments          7    23  9.977391 <.0001
## Time:Treatments    14    45  2.213393  0.0223

#summary(model)

marginal <- emmeans(model, pairwise ~ Time * Treatments)
plot(marginal, comparisons=T)
```



```
lsmip (model, Treatments~Time)
```



```
kable(CLD(marginal$emmeans), row.names = F)
```

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
0	Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
0	oWSF+pBMC-BC	0.000	569.1705	23	-1177.4190	1177.419	1
0	Control	0.000	492.9161	30	-1006.6691	1006.669	1
2	oWSF+pBMC-BC	0.000	569.1705	23	-1177.4190	1177.419	1
0	oWSF	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
2	oWSF	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
2	Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
2	pBMC-BC+Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
0	pBMC-BC+Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
0	pBMC-BC	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
2	pBMC-BC	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
1	oWSF	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
1	pBMC-BC+Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
1	pBMC-BC	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1

Time	Treatments	emmean	SE	df	lower.CL	upper.CL	.group
2	Control	0.000	492.9161	30	-1006.6691	1006.669	1
1	oWSF+pBMC-BC	0.000	569.1705	23	-1177.4190	1177.419	1
1	Control	0.000	492.9161	30	-1006.6691	1006.669	1
1	Corexit 9500	0.000	492.9161	23	-1019.6747	1019.675	1
0	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	587.575	492.9161	23	-432.0997	1607.250	12
0	oWSF+Corexit 9500	865.125	492.9161	23	-154.5497	1884.800	12
1	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	1508.845	565.3197	23	339.3919	2678.298	123
2	oWSF+pBMC-BC+Corexit 9500	2664.025	492.9161	23	1644.3503	3683.700	123
1	oWSF+Corexit 9500	3180.725	492.9161	23	2161.0503	4200.400	23
2	oWSF+Corexit 9500	4243.575	492.9161	23	3223.9003	5263.250	3

```
#DT::datatable(data.frame(marginal$contrasts),options=list(pageLength = 20))
```

B



FIGURE S2 Pictures of all replicates of each treatment in T0, T1 and T2 on Coral Watch Health Card. A) Treatments without Corexit® 9500c; B) Treatments with Corexit® 9500c.

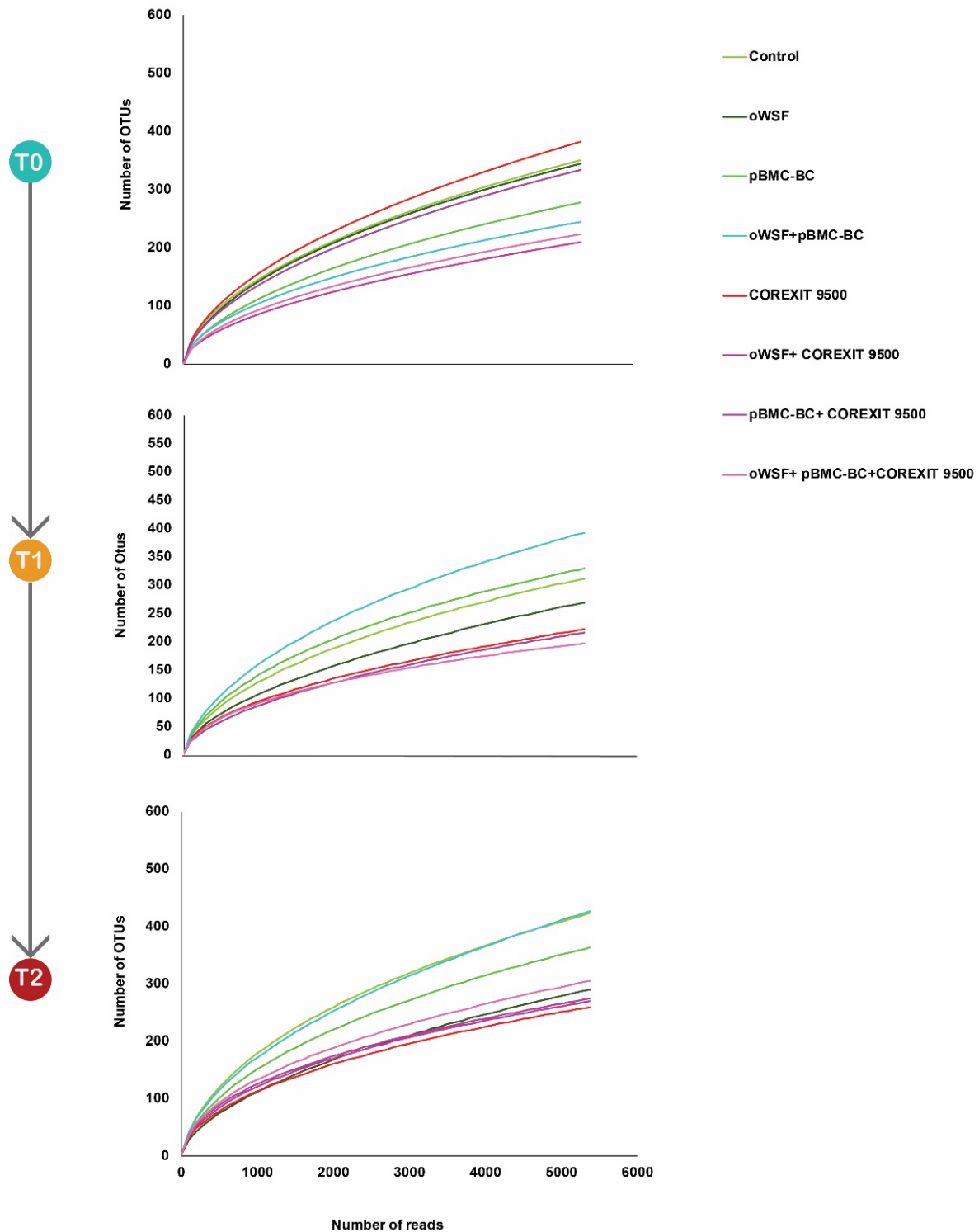


FIGURE S3 Rarefaction curve representing the α -diversity analysis of the bacterial community based on the partial sequences of 16S subunits of ribosomal RNA among all treatments throughout time.

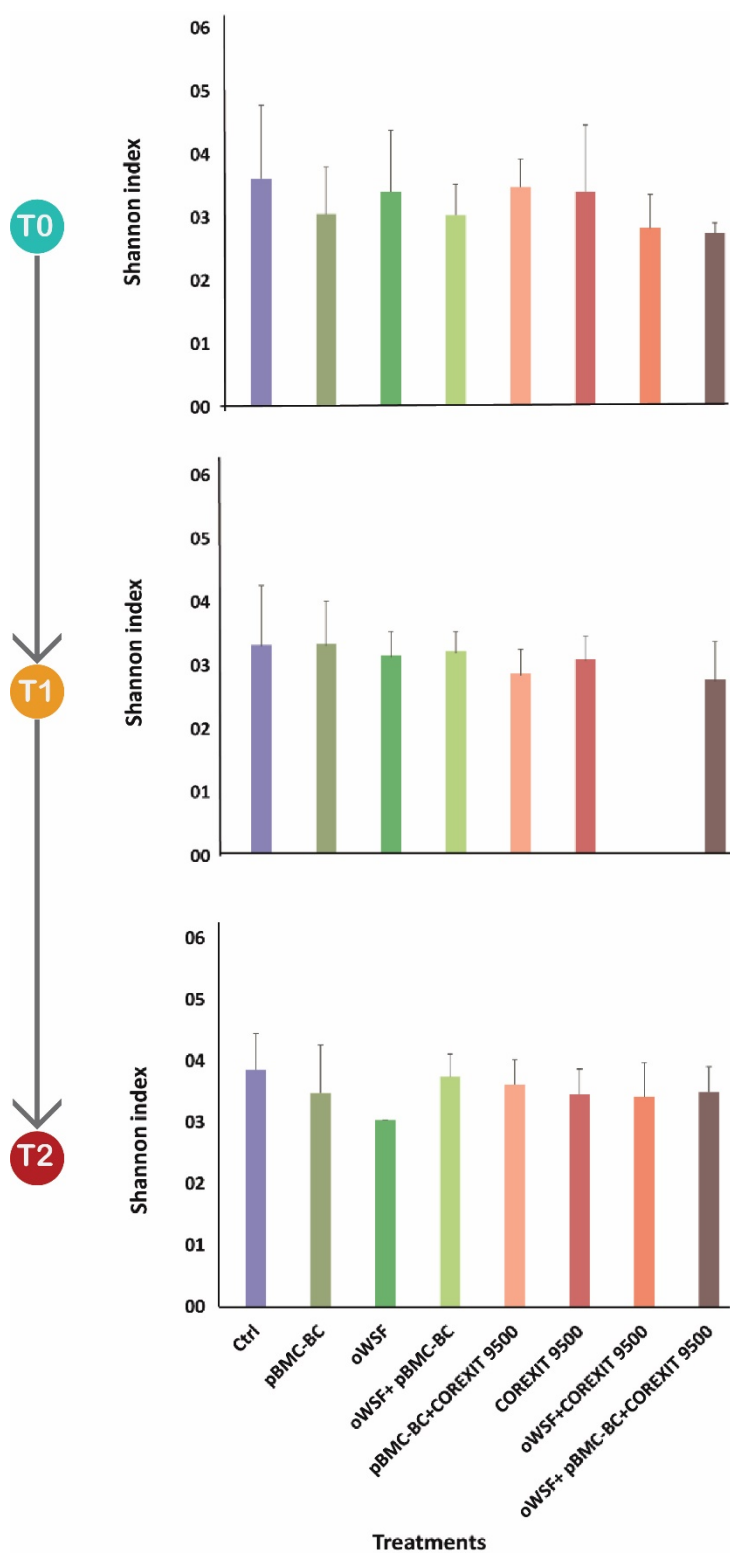


FIGURE S4 Estimation of OTU richness through the Shannon diversity index among all treatments throughout time of experiment.

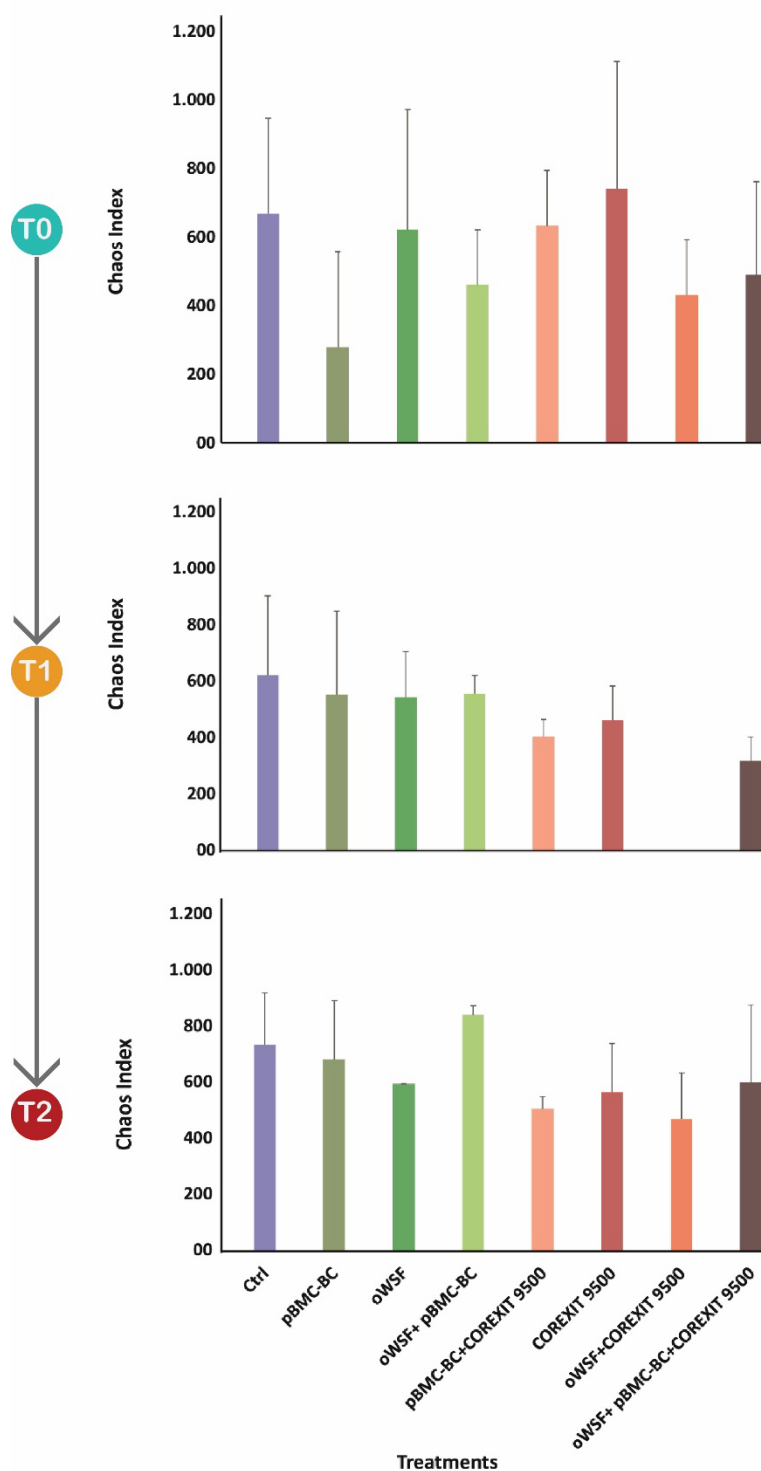


FIGURE S5 Estimation of OTU richness through the Chao diversity index among all treatments throughout time of experiment.

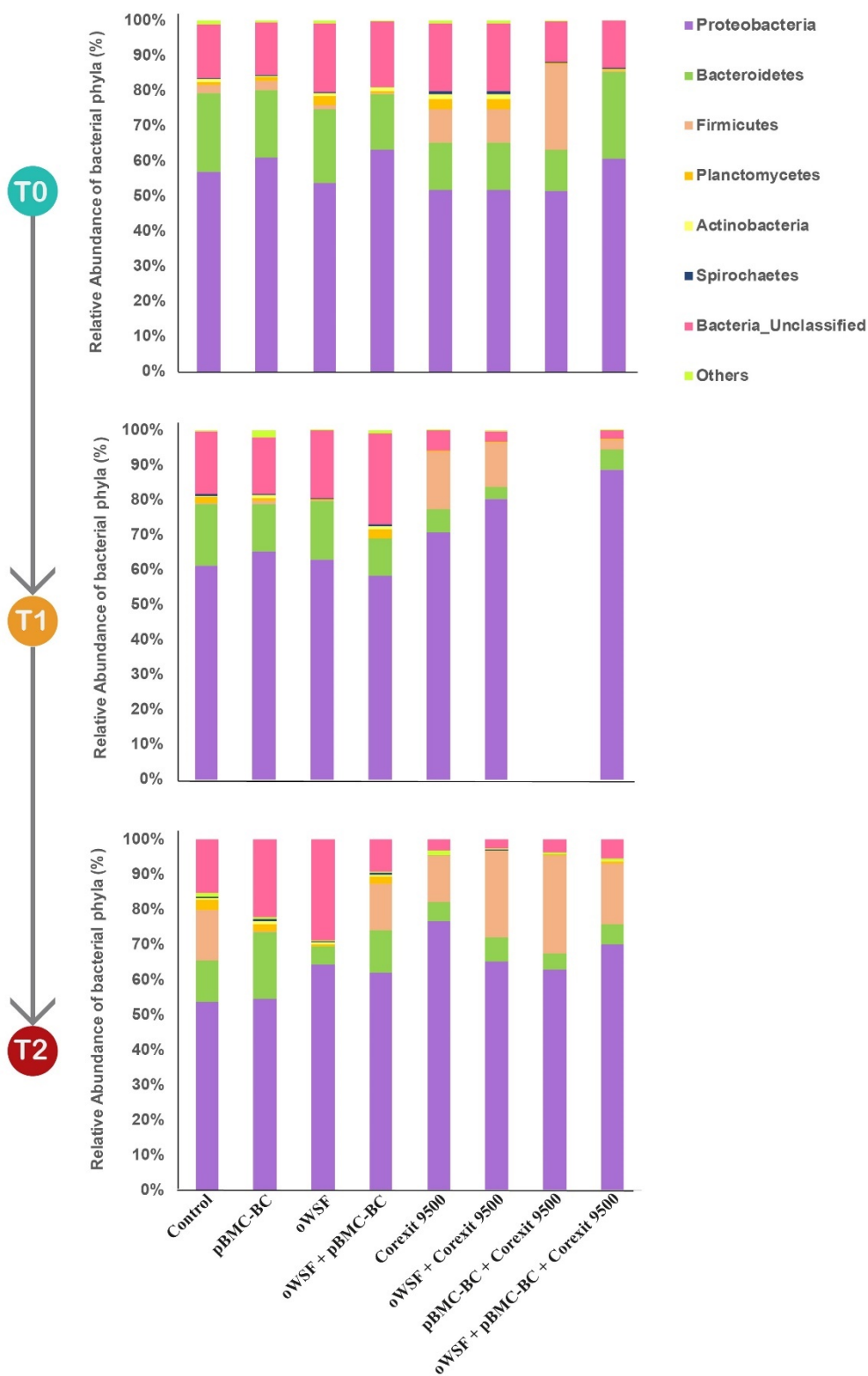


FIGURE S6 Phylogenetic distribution of the bacterial phylum based on the DNA sequences obtained from the fragment of the 16S subunit of ribosomal RNA among all treatments throughout time.

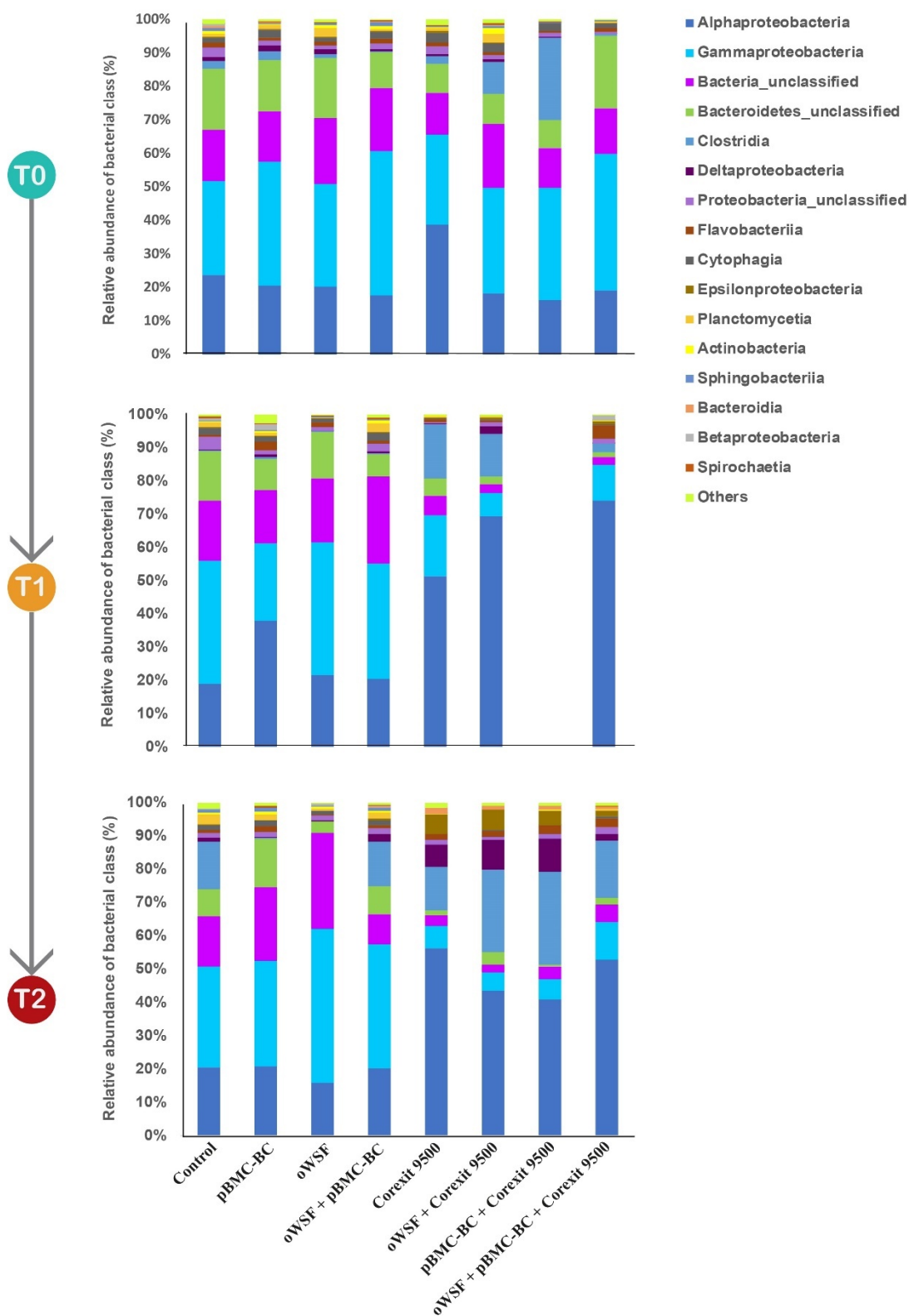


FIGURE S7 Phylogenetic distribution of the bacterial class detected in the Proteobacteria phylum based on the DNA sequences obtained from the fragment of the 16S subunit of ribosomal RNA.

SUPPLEMENTARY TABLES LEGENDS

TABLE S1 Details of the conditions and sources used to isolate consortium members, as well as the NCBI deposit IDs.

Strain code	Taxonomy	Isolation conditions	Source	Accession Number
#4	<i>Halomonas aquamarina</i>	2% WSF, 8% NaCl, BH	Seawater	MK167383
#10	<i>Pseudoalteromonas shioyasakiensis</i>	2% WIF, 2.5% NaCl, BH	Seawater	MK167389
#15	<i>Cobetia marina</i>	2% WSF, 2.5% NaCl, BH	<i>Siderastrea stellata</i>	MK167376
#17	<i>Shewanella sp.</i>	2% WSF, 2.5% NaCl, BH	<i>Siderastrea stellata</i>	MK167377
# D22M	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	2% WSF, 2.5% NaCl, BH	<i>Millepora alcicornis</i>	MK167392
#D24M	<i>Cobetia Marina</i>	2% WSF, 2.5% NaCl, BH	<i>Millepora alcicornis</i>	MK167393
#1229	<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	10% WSF, 0.1% glucose, 0.05% yeast extract	Filtered seawater	MK263185
#1227	<i>Geotrichum sp.</i>	10% WSF, 0.1% glucose, 0.05% yeast extract	Filtered seawater	MK263184
#1334	<i>Penicillium citrinum</i>	WSF 2.5% NaCl	<i>Millepora alcicornis</i>	MK263186

TABLE S2 Results of the Three- way PERMANOVA test of β -diversity analyses conducted on all treatments and time.

Three-ways PERMANOVA							
Source	df	SS	MS	Pseudo- F	P (perm)	Unique perms	P (MC)
O	1	2427.1	2427.1	1.2881	0.185	995	0.186
Disp	24986	24986	13.26	0.001	999	0.001	0.001
C	1	1827.2	1827.2	0.969	0.436	998	0.439
Ti	2	23564	11782	62526	0.001	997	0.177
O x Disp	1	2475	2475	1.3134	0.171	999	0.177
O x C	1	1311.6	1311.6	0.69604	0.817	999	0.784
O x ti	2	3286.3	1643.1	0.872	0.668	998	0.646
Disp x C	1	2282.3	2282.3	1.2112	0.21	999	0.262
Disp x ti	2	18533	9266.5	4.9176	0.001	999	0.001
C x ti	2	3185.3	1592.7	0.84521	0.704	998	0.668
O x Disp x C	1	1944	1944	1.0316	0.375	998	0.379
O x Disp x Ti	2	4487.4	2243.7	1.1907	0.194	999	0.229
O x C x Ti	2	2776.6	1388.3	0.73674	0.862	997	0.847
Disp x C x Ti	2	4441.9	2220.9	1.1786	0.222	997	0.21
O x Disp x C x Ti	1	873.32	873.32	0.46346	0.991	999	0.976
Res	51	96102.00	1884.3				
Total		73	2.0019				
			E+05				

TABLE S3 Pairwise three-way PERMANOVA test of β -diversity analyses comparing of all times of the experiment.

Pairwise Tests three-ways PERMANOVA				
Time	t	P (perm)	Unique perms	P (MC)
0 and 1	2.4982	0.001	999	0.001
0 and 2	2.9168	0.001	996	0.001
1 and 2	1.301	0.062	998	0.079