

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
CENTRO DE CIÊNCIA DA SAÚDE  
PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA VEGETAL E BIOPROCESSOS

**Otimização de técnicas de cultivo de *Pocillopora damicornis* utilizando micro-organismos benéficos para corais (BMCs) e desenvolvimento de um sistema experimental**

JULIANA MARINS DE ASSIS

RIO DE JANEIRO  
2020

JULIANA MARINS DE ASSIS

**Otimização de técnicas de cultivo de *Pocillopora damicornis* utilizando micro-organismos benéficos para corais (BMCs) e desenvolvimento de um sistema experimental**

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

Orientadora: RAQUEL SILVA PEIXOTO

AGOSTO 2020

## CIP - Catalogação na Publicação

AA848o Assis, Juliana Marins de  
Otimização de técnicas de cultivo de Pocillopora damicornis utilizando micro-organismos benéficos para corais (BMCs) e desenvolvimento de um sistema experimental / Juliana Marins de Assis. -- Rio de Janeiro, 2020.  
89 f.

Orientadora: Raquel Peixoto.

Coorientador: Gustavo Duarte.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Decania do Centro de Ciências da Saude, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal, 2020.

1. BMC. 2. Pocillopora damicornis. 3. Brachionus plicatilis. 4. Bioencapsulação. 5. Sistema experimental. I. Peixoto, Raquel, orient. II. Duarte, Gustavo, 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.

JULIANA MARINS DE ASSIS

**Otimização de técnicas de cultivo de *Pocillopora damicornis* utilizando micro-organismos benéficos para corais (BMCs) e desenvolvimento de um sistema experimental**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos.

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Raquel Silva Peixoto – Orientadora  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Prof. Dr. Ricardo Moreira Chaloub  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Prof. Dr. Marcelo Vianna  
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

---

Profa. Dr. Henrique Fragoso dos Santos  
Universidade Federal Fluminense – UFF

## **AGRADECIMENTOS**

Terminei a faculdade de biologia marinha em 2013 e, infelizmente, passei por situações que me desanimaram a continuar na pesquisa. Assim que terminei a minha graduação, fiz perícia ambiental na PUC, morei na Guatemala, estudei para concurso público, mas ainda tinha o sentimento de que deveria voltar a fazer pesquisa, a crescer profissionalmente nessa área. Com isso, voltei aos estudos e comecei a fazer licenciatura na CEDERJ em Petrópolis. Foi incrível, me ajudou a sentir novamente o prazer que senti no bacharelado. Mas não era fácil porque trabalhava como administradora de uma empresa em Niterói e ia a Petrópolis todo fim de semana.

Um belo dia, tive uma grande oportunidade em fazer mestrado com a professora Raquel Peixoto e, quando a conheci, senti que seria o momento ideal para crescer profissionalmente, e assim aconteceu.

Em dezembro de 2017 fui selecionada na pós-graduação de Biotecnologia e Bioprocessos, em 2018 participei de workshops com grandes pesquisadores, fui a Alemanha participar do ISME, e, em 2019, finalizei o sistema experimental totalmente inovador, participei do workshop sobre pesquisa no Aquário Marinho do Rio de Janeiro e participei do BAGECO em Portugal. Em 2020, consegui rodar meu experimento e veio a pandemia, forçando-nos a seguir por outros caminhos.

Hoje, ao olhar para trás, vejo que sai do nível de mais uma aluna na vida acadêmica para uma profissional com grande conhecimento em aquicultura, microbiologia e desenvolvimento de projetos. Vesti a camisa do LEMM com muito orgulho nesse mestrado e não me arrependo de nada que fiz, pois pesquisa é isso, é dedicação e amor o tempo todo.

Com isso, gostaria de agradecer a Raquel Peixoto pela oportunidade. Obrigada pelo acolhimento, pelas palavras de conforto e por ser tão parceira! Gostaria de agradecer as minhas “Bonitas do PBV”: Denise, Erika, Helena, Caren e Junia que me abraçaram e me incluíram no grupo. Ao Edir, meu “migo” técnico, que me ensinou muito no laboratório e me fazia companhia nos almoços e cafés. Ao Marcos (que já se aposentou, mas fez parte dessa jornada) por ter me apoiado. Ao Phillippe por toda ajuda com o BMC, ao Pedro me ajudando quando pode, ao Gustavo pelas dicas no AquaRio, ao João por sua alegria no laboratório e ajuda, a Camilinha e ao Eikon por serem pessoas tão dispostas a ajudar, a Dani que nos ajuda sempre, ao meu amigo Fluvio que me ajuda muito e sempre está ao meu lado e a Maria que já chegou colocando o povo para sair e se divertir, além de sempre ajudar. Aos meus

“desesperados do mestrado”: João, Sula e Thuanne - obrigada por cada conselho, cada conversa e cada abraço. Obrigada a todos os professores que me deram suporte nesse mestrado como Caio Rachid, Alexandre Rosado, Fernanda Abreu, Ricardo Chaloub, Henrique Fragoso, Marcio Alves e Andrew Macrae.

Ao povo do AquaRio, meu muito obrigada! Dentre tantos profissionais, gostaria de agradecer pela ajuda na quarentena ao Valdeco, Cleyton e Edu (meus queridos noturnos que me ajudavam a qualquer momento), Nath, Carlos, Ingrid, Dani Vet, Angelica, Nay, Rodrigão, Mari Bio, Volmer, Baia, Igor, Bombinha, Silvino, Amanda, Massa, Xande, Pará, Rogério, Emerson e todos da manutenção – Agradeço a cada um pela ajuda no meu sistema ao abraço e sorriso de todos os dias – vocês me acolheram e me sentia até do manejo, o que diferenciava era o jaleco). Obrigada Matheus Felix, Tiê e Carol por todo apoio que me deram e por terem paciência comigo. Também gostaria de agradecer ao Rafael Franco que me ensinou muito sobre aquicultura, que me ajudou na construção do meu sistema experimental e me deu todo suporte nesse tempo. Muito obrigada aos meus amigos do laboratório: Gabi, Debora, Paty e Gerard – Vocês são incríveis. A Rayssa que me ajudou com os rotíferos, muito obrigada pela ajuda, foi super importante! Ao povo do almoxarifado, Albert, Mineiro! Ao Centro de Pesquisa do AquaRio que apoiou meu projeto e disponibilizou verba para que acontecesse! Meu muito obrigada por tudo que fizeram por mim, o AquaRio foi a minha segunda casa e tem um lugar especial em meu coração e em minhas orações!

Sobre as pessoas de fora da minha vida acadêmica, gostaria de agradecer aos meus pais que me deram suporte em todo esse período. Obrigada, amo vocês! Aos meus familiares que comemoraram cada conquista nesse tempo. Aos meus amigos Bruno Braat, Raquel Reis, Franciane, Fernanda Atalla, Jéssica Mesquita, Ana Gabriela, Alexandre que entenderam meus sumiços quando estava trabalhando até nos finais de semana.

*Eu lutei e venci muitos obstáculos nesse mestrado, e tenho muito orgulho do meu crescimento pessoal e profissional. E todas essas pessoas tiveram uma grande importância nessa fase da minha vida.*

## RESUMO

Recifes de corais estão ameaçados por alterações ambientais e ações antrópicas, afetando negativamente a homeostase do coral holobionte, incluindo seu microbioma, que responde rapidamente às variações nas condições ambientais. Estratégias de mitigação dos impactos e aumento da resiliência de corais vem sendo exploradas. Além disso, estudos em laboratório comprovaram que a utilização de probióticos pode contribuir para o aumento da resistência dos corais contra impactos ambientais. Para que esses probióticos sejam testados e utilizados em sistemas mais complexos, é necessário que sejam desenvolvidos métodos que facilitem a aplicação e entrega desses probióticos para os corais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de desenvolver uma estratégia de carreamento de micro-organismos benéficos para corais (BMC) através da bioencapsulação do rotífero *Brachionus plicatilis*. Para testar esse sistema de entrega, um consórcio BMC previamente obtido e estudado foi testado para características benéficas complementares, relacionadas à calcificação dos corais, com potencial papel em acelerar o crescimento desses organismos. O carreamento do BMC foi testado através do enriquecimento de rotíferos com esses BMCs e posterior alimentação heterotrófica dos corais com os rotíferos carreadores de BMC. Imagens de microscopia de fluorescência e de varredura demonstraram o caminho percorrido pelo BMC marcado nos rotíferos, comprovando sua presença dentro e fora (aderidos a membrana celular) do corpo dos rotíferos, enquanto imagens e vídeos confirmaram que o coral *P. damicornis* se alimenta do rotífero *B. plicatilis* enriquecido com BMCs. Em paralelo, um novo sistema experimental foi desenvolvido para que, futuramente, esse e outros métodos de carreamento de BMC possam ser testados. Os parâmetros biológicos e físico-químicos desse novo sistema se mostraram estáveis durante o monitoramento realizado ao longo de 60 dias. Em conclusão, os resultados gerados nesse trabalho indicam que a utilização de rotíferos como carreadores de BMCs pode ser uma alternativa eficiente para estudos de longa duração e que o novo sistema de experimental se apresentou capaz de simular as variações de irradiância, temperatura e nutrientes de maneira estável.

**Palavras-chave:** BMC. *Pocillopora damicornis*. *Brachionus plicatilis*. Carreadores. Bioencapsulação. Microscopia de fluorescência. Microscopia de varredura. Sistema experimental.

## ABSTRACT

Coral reefs are threatened with environmental changes and anthropic actions, negatively affecting the homeostasis of the coral holobiont, including its microbiome, which responds rapidly to environmental changes. Strategies to mitigate impacts and increase coral resilience have been explored. In addition, laboratory trials have proven that the use of probiotics can contribute to increased coral resistance against environmental impacts. For these probiotics to be tested and applied in more complex systems, delivery methods must be developed to facilitate its application. Thus, the objective of this work was to develop a strategy of carrying beneficial microorganisms for corals (BMCs) through the bioencapsulation of the rotifer *Brachionus plicatilis*. To test this delivery system, a previously obtained and studied BMC consortium was tested for complementary beneficial characteristics related to coral calcification, with potential role in accelerating the growth of these organisms. The BMC transport was tested through the enrichment of rotifers with these BMCs and subsequent heterotrophic feeding of corals with rotifer BMC carriers. Fluorescence microscopy and scanning images demonstrated the path taken by the BMC marked in the rotifers, proving its presence inside and outside (adhered to the cell membrane) of the rotifer's body, while images and videos confirmed that the *P. damicornis* coral feeds on the rotifer *B. plicatilis* enriched with BMCs. In parallel, a new experimental system has been developed so that, in the future, this and other BMC carrying methods can be tested. The biological and physicochemical parameters of this new system were stable during the monitoring carried out over 60 days. In conclusion, the results generated in this study indicate that the use of rotifers as carriers of BMCs can be an efficient alternative for long-term studies and that the new experimental system was able to simulate variations in irradiance, temperature and nutrients in a stable way.

**Keywords:** BMC. *Pocillopora damicornis*. *Brachionus plicatilis*. Carriers. Bioencapsulation. Fluorescence microscopy. Scanning microscopy. Experimental system.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Representação da relação do coral hospedeiro com seus micro-organismos associados e suas potenciais funções na saúde do coral. Fonte: Adaptada de Peixoto e colaboradores (2017). 27
- Figura 2:** (A) Etapas da seleção e montagem de um consórcio com micro-organismos potenciais BMC; (B) Estratégias de aplicação de BMCs em diferentes contextos para a preservação recifal. Fonte: Adaptada de Peixoto e colaboradores (2017). 29
- Figura 3:** Etapas de degradação do ecossistema recifal com impacto das mudanças climáticas. Fonte: Adaptado de Ainsworth e colaboradores (2016). 35
- Figura 4:** (A) Variação da estrutura esquelética de *Pocillopora damicornis* em diferentes habitats. Adaptado de Veron (1976); (B) Mapa da distribuição geográfica do coral *Pocillopora damicornis*. Fonte: Adaptado da “Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas” da IUCN (2020-1). 37
- Figura 5:** Fotomicrografia ótica do rotífero *Brachionus plicatilis* utilizado neste estudo obtida pelo microscópio Zeiss Axioimager (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany). Fonte: própria autoria. 42
- Figura 6:** Esquema mostrando os tratamentos feitos para obter as imagens em Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV). 51
- Figura 7:** Esquema apresentando os tratamentos para analisar a interação de cada bactéria e do consórcio BMC com o rotífero *Brachionus plicatilis* usando Microscopia de fluorescência. Tratamentos com cada bactéria do consórcio BMC (1 a 7), seguindo com o tratamento do rotífero com BMC (8), somente com BMC (9) e com rotífero sem BMC (controle) (10). 52
- Figura 8:** Ilustração esquemática da metodologia aplicada para a análise da captura do rotífero *Brachionus plicatilis* pelo coral *Pocillopora damicornis*. 52
- Figura 9:** Representação esquemática do sistema experimental feita no Sketchup apresentando os dezesseis aquários na parte superior das prateleiras, os dezesseis *sumps* presentes na parte inferior. A passagem de água gelada ocorre dentro dos canos de PVC que ficam no *sump* (canos brancos). 54
- Figura 10:** Imagem de fragmento de colônia de *Pocillopora damicornis* nos aquários experimentais, apresentando suas ramificações e coloração (Imagens de própria autoria). 55
- Figura 11:** Meio de cultura plaqueado que foi utilizado no estudo com crescimento das BMCs previamente selecionadas por Rosado e colaboradores (2019). (A) Meio urease com uma *Pseudoalteromonas sp* (BMC1) com alteração na coloração da placa; (B) Meio urease com uma *Pseudoalteromonas sp* (BMC2) com alteração na coloração da placa e crescimento de colônias. 57
- Figura 12:** Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis*. (A) Cultura a fresco apresentando a morfologia do rotífero alimentado; (B) Visualização da autofluorescência, com filtro para fluorescência verde (C) Visualização da 58

autofluorescência, com filtro para fluorescência vermelha; (D) Cultura a fresco apresentando a morfologia do rotífero em jejum; (E) ausência de autofluorescência, com filtro para fluorescência verde; (F) ausência de autofluorescência, com filtro para fluorescência vermelho.

**Figura 13:** Fotomicrografia das bactérias do consórcio BMC com diferentes marcações, visualizadas pelo microscópio Zeiss Axio Imager. (A) O BMC sem corante fluorescente; (B) O BMC marcado com o corante SYTO 9, que fluoresce em verde as células saudáveis; (C) O BMC marcado com Iodeto de propídio. A o que indica não observância de fluorescência em vermelho reflete a ausência de células mortas. 59

**Figura 14:** Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis* com BMC em fluorescência. (A) Adição do BMC marcado no meio com rotíferos para acompanhar a interação. (B) Microscopia de fluorescência (Alexa Fluor 489), com a observação das bactérias vivas no trato gastrointestinal do rotífero. A estrela corresponde a região oral do rotífero. (C) Visualização das células danificadas ou mortas. 60

**Figura 15:** Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis* em fluorescência. Na imagem A, observa-se o rotífero com bactérias presentes no meio (seta vermelha), formando um aglomerado em sua boca (estrela). Na imagem B, observa-se a presença das bactérias no meio (seta vermelha), na região da boca (estrela) e fazendo um caminho no seu sistema digestório (seta branca com pontilhados), e a seta amarela representa a distância entre a extremidade do rotífero até o centro do seu corpo afim de demonstrar o local exato de fluorescência. 61

**Figura 16:** Microscopia das principais estirpes bacterianas do BMC testado. (A-C) *Pseudoalteromonas sp.* (BMC 1); (D-F) *Pseudoalteromonas sp.* (BMC 2); (G-I) *Pseudoalteromonas sp.* (BMC 3); (J-L) *Halomonas sp.* (BMC 7). (A, D, G e J) Adição do BMC marcado no meio com rotíferos para acompanhar a interação; (B, E, H e K) Microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas em verde (Alexa Fluor 489). (C, F, I e J) Observação de células danificadas ou mortas em vermelho. 63

**Figura 17:** Microscopia eletrônica de varredura com os tratamentos rotíferos-BMC, com incubação por 4 horas, *overnight* e controle. (A) e (D) Tratamento de 4 horas, com a presença de bactérias nos cílios da região oral do rotífero (estrela); (B) e (E) Tratamento *overnight*, com a presença de bactérias no corpo do rotífero (seta branca); (C) e (F) Tratamento controle, com a presença de pequenos artefatos decorrentes do processamento da amostra, (círculo preto) sem a presença de bactéria. 63

**Figura 18:** Etapas de captura do rotífero *B. plicatilis* pelo coral *P. damicornis*. (A) Pólipo do coral iniciando a contração após capturar o rotífero (seta branca); (B) Pólipo totalmente contraído, empurrando o rotífero para seu interior; (C) O pólipo contraído (seta branca) e rotíferos nadando ao redor da colônia (círculo branco); (D) Pólipos do coral totalmente abertos para capturar o rotífero. 64

**Figura 19:** Sistema experimental para monitoramento do coral *P. damicornis* e dos parâmetros físico-químicos da água. (A) A ilustração na parte superior esquerda representa os quatro tratamentos (rotífero com BMC, rotífero, 65

BMC e controle). (B) À direita, o sistema experimental montado com os corais nas bases e distribuídos de forma randômica. (C) As análises de água feitas no sistema experimental e os equipamentos utilizados nos aquários e nos *sumps*. Cada aquário possui seu próprio sistema de refrigeração e circulação da água.

**Figura 20:** Análise do rendimento fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) através do teste-T que apresentou o *p-value* maior que 0.05 ao comparar os quatro grupos de replicatas biológicas. 66

**Figura 21:** Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de amônia; (B) o gráfico de nitrito; (C) o gráfico de nitrato. 67

**Figura 22:** Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de salinidade; (B) o gráfico de pH; (C) o gráfico de constante de hidrólise (kH). 68

**Figura 23:** Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de potássio; (B) o gráfico de fosfato; (C) o gráfico de iodo. 69

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Variação do crescimento linear de *Pocillopora damicornis* em 37 diferentes regiões do leste do Oceano Pacífico.

## LISTA DE ABREVIATURAS

DNA: Ácido desoxirribonucleico

kb: Quilo base

h: Hora (s).

LED: *Light Emitting Diode*

m: Massa.

MA: Marine Ágar

MB: Marine Broth

MEV: Microscopia eletrônica de varredura

PCR: Reação em cadeia da polimerase

RNA: Ácido ribonucleico

RNAr: Ácido ribonucleico ribossomal

UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro

UV: Ultravioleta

v: Volume

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Os recifes de coral</b>	<b>15</b>
<b>1.2 Microbiologia dos corais</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Micro-organismos benéficos para corais (BMCs)</b>	<b>18</b>
<b>1.4 Calcificação dos corais</b>	<b>21</b>
<b>1.5 Impactos dos estresses ambientais nos recifes de coral</b>	<b>23</b>
1.5.1 O aumento da temperatura dos oceanos e o branqueamento dos corais	<b>24</b>
1.5.2. Acidificação dos oceanos	<b>25</b>
<b>1.6 Coral <i>Pocillopora damicornis</i></b>	<b>26</b>
<b>1.7 Restauração recifal</b>	<b>28</b>
<b>1.8 Heterotrofia em corais</b>	<b>29</b>
<b>1.9 Rotífero <i>Brachionus plicatilis</i></b>	<b>31</b>
<b>1.10 Bioencapsulação do BMC pelo rotífero</b>	<b>33</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>34</b>
<b>3. OBJETIVO</b>	<b>35</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>35</b>
<b>3.2 Etapas desenvolvidas</b>	<b>35</b>
<b>4. METODOLOGIA</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Avaliação da atividade da enzima urease por BMCs previamente selecionadas</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Preparo do consórcio BMC</b>	<b>36</b>
<b>4.3 Bioencapsulação do rotífero <i>Brachionus plicatilis</i> com BMC</b>	<b>37</b>
4.3.1 Avaliação da viabilidade do BMC no rotífero através de Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)	<b>37</b>
4.3.2. Avaliação da viabilidade do BMC no rotífero através da Microscopia de fluorescência	<b>39</b>
<b>4.4 Alimentação do coral <i>Pocillopora damicornis</i> com o rotífero <i>Brachionus plicatilis</i></b>	<b>40</b>
<b>4.5 Desenvolvimento do sistema experimental</b>	<b>41</b>
<b>4.6 Validação do sistema experimental</b>	<b>42</b>

4.6.1 Acclimação da <i>Pocillopora damicornis</i> no sistema experimental	42
4.6.2 Validação do sistema experimental através do <i>Fv/Fm</i> e dos parâmetros físico-químicos	43
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Seleção e identificação de potenciais BMCs para o processo calcificação</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Bioencapsulação do BMC pelo rotífero <i>Brachionus plicatilis</i></b>	<b>45</b>
<b>5.3 Alimentação do coral com o rotífero <i>Brachionus plicatilis</i></b>	<b>52</b>
<b>5.4 Desenvolvimento do sistema experimental</b>	<b>53</b>
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>58</b>
<b>7. CONCLUSÃO</b>	<b>65</b>
<b>8. REFERÊNCIAS</b>	<b>66</b>
<b>9. ANEXO</b>	<b>87</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Os recifes de coral

Os recifes de coral estão entre os ecossistemas mais biodiversos do planeta, abrigando cerca de 25% de toda a biodiversidade marinha, comparável à encontrada em florestas tropicais (REAKA-KUDLA et al. 1997; KNOWLTON et al. 2010; NOAA, 2020). Essa grande diversidade de espécies, e o fato de recifes serem o suporte para a reprodução e desenvolvimento de, aproximadamente, 30% das espécies de peixes presentes nos oceanos (FISHER et al., 2015), fazem desses ambientes extremamente importantes tanto ecológica quanto economicamente. Dessa forma, recifes de coral são essenciais para a atividade pesqueira, são fonte de alimento para a população e para o comércio ornamental marinho, servem de atração para turistas, além de serem fonte de prospecção de compostos com potencial para aplicação em diversos tipos de indústria, como a farmacêutica, a biotecnológica, a cosmética, entre outras (SANG et al., 2019). Adicionalmente, recifes conferem proteção da costa marítima contra erosão e alagamentos (RIEGL et al., 2009; HALPERN et al., 2012). Essas características conferem aos recifes de coral um grande valor econômico agregado. Por exemplo, apenas a Grande Barreira de Corais, na Austrália, gera cerca de 6 bilhões de dólares anuais para a economia do país (HOEGH-GULDBERG, 2019).

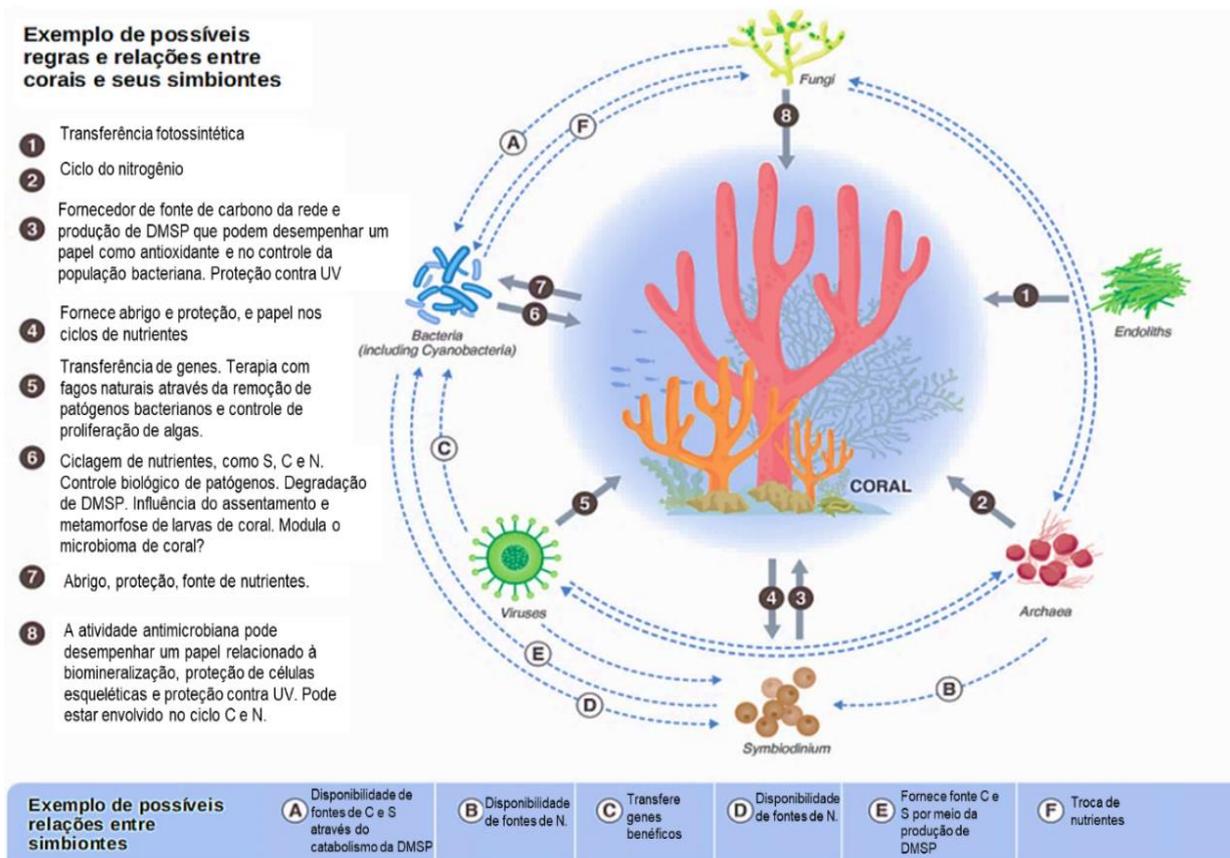
Em ecossistemas recifais, destacam-se os corais, que são os principais organismos construtores dos recifes. Os corais são invertebrados marinhos do filo Cnidária que possuem representantes da classe Anthozoa, chamados corais verdadeiros, e Hydrozoa, também conhecidos como hidrocorais ou corais-de-fogo (GATES, 1999; BRUSCA; BRUSCA, 2003). Em geral, os corais são poliploides sésseis que vivem em forma de colônias. São animais diploblásticos, que possuem uma estrutura anatômica caracterizada por uma epiderme (camada externa) e gastroderme (camada interna). Essas duas camadas de células, por sua vez, são separadas por uma região intermediária denominada mesogleia, que na maioria dos casos, é conectada a um esqueleto calcário poroso constituído de carbonato de cálcio. Sobre a camada da epiderme, é constantemente secretado o muco por células especializadas chamadas mucócitos, constituído por proteínas, polissacarídeos e lipídeos, que reveste todo o animal (MILLER; HARLEY, 2001; BRUSCA; BRUSCA, 2003; ROSENBERG et al., 2007; AINSWORTH et al., 2010; SANTHANAM, 2020).

Alguns corais e hidrocorais de águas rasas estabelecem uma relação de simbiose com dinoflagelados da família Symbiodiniacea (anteriormente classificados no gênero *Symbiodinium*), e por isso são conhecidos como corais zooxantelados. A família Symbiodiniacea é atualmente dividida em 7 novos gêneros (LAJEUNESSE et al., 2018) conhecidos popularmente como zooxantelas (BRUSCA; BRUSCA, 2003; TANAKA et al., 2014). A associação simbiótica coral-Symbiodiniacea é extremamente importante para a sobrevivência do coral, uma vez que a alga fornece de 90% a 130% das necessidades nutricionais e energia aos corais, que utilizam o carbono fixado fotossinteticamente pela Symbiodiniacea (FALLOWSKI et al., 1984; MUSCATINE, 1990; SOROKIN et al., 1992; ROSENBERG et al., 2007; ALEMMAND; FULA, 2018). Ao mesmo tempo, o coral fornece aos dinoflagelados um ambiente protegido contra predadores e os compostos necessários para a realização da fotossíntese, como o dióxido de carbono produzido pela respiração dos corais, além de nutrientes inorgânicos, como compostos nitrogenados, que são resíduos do metabolismo dos corais (ALEMMAND; FULA, 2018). Um outro fator benéfico dessa associação simbiótica é que o oxigênio produzido pela fotossíntese pode ser utilizado na respiração do coral, ao passo que altas concentrações de oxigênio podem resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) que, em concentrações controladas, podem promover a proteção do hospedeiro a infecções (BANIN et al., 2003; ROSENBERG et al., 2007). Dessa forma, observa-se que a relação ecológica entre o coral e as algas dinoflageladas compreende uma troca mútua de compostos benéficos para ambos os organismos, e se torna peça essencial para o estabelecimento desses animais no ecossistema marinho e, conseqüentemente, para a construção dos recifes (VAN LUNTEREN, 2015; MENDOZA-BECERRIL, 2020).

## **1.2 Microbiologia de corais**

Além da simbiose com as zooxantelas, os corais vivem associados a micro-organismos pertencente aos três domínios da vida (Bacteria, Archaea e Eukarya), que são fundamentais para a manutenção da saúde dos corais. Embora muitos micro-organismos possam apresentar impactos negativos para a saúde dos corais, como aqueles que são patogênicos (SWEET et al., 2012; SWEET et al., 2017), outros grupos microbianos são essenciais para a promoção da saúde do hospedeiro, como os micro-organismos benéficos para corais (BMCs) (PEIXOTO et al., 2017).

Os corais são considerados metaorganismos - isto é, a soma de um hospedeiro eucarioto e seus micro-organismos associados, funcionando como uma unidade biológica funcional (BOSCH; MCFALL-NGAI, 2011; AINSWORTH et al., 2015). A relação corais - micro-organismos é essencial para a sobrevivência do metaorganismo, pois os simbiontes participam do metabolismo do hospedeiro, da ciclagem de nutrientes, da produção de compostos antimicrobianos e da competição biológica (GARREN; AZAM, 2012; THOMPSON et al., 2014), sendo fundamentais na manutenção do equilíbrio do ecossistema recifal como um todo (Figura 1).



**Figura 1. Representação da relação do coral hospedeiro com seus micro-organismos associados e suas potenciais funções na saúde do coral (Adaptada de PEIXOTO et al., 2017).**

Dentre os micro-organismos associados a corais podemos encontrar diversos grupos de bactérias, fungos, arqueias, vírus e protistas (KELLOGG, 2019). A composição microbiana do metaorganismo é dinâmica e complexa, podendo variar de acordo com a genética do hospedeiro e através de alterações ambientais, geralmente com uma rápida resposta dos grupos microbianos (AINSWORTH, THURBER; GATES, 2009). Além disso, o microbioma dos corais pode influenciar na capacidade adaptativa

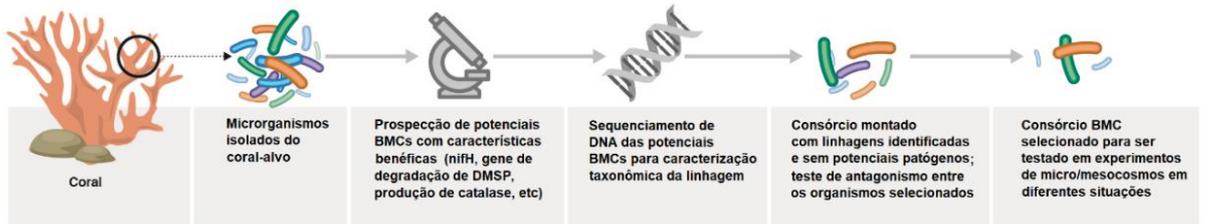
do hospedeiro frente à estresses ambientais. As diferentes condições do ambiente podem levar a uma habilidade distinta de resposta das espécies de coral, de acordo com a resistência de cada espécie e com as pressões seletivas que esses metaorganismos estão submetidos (BOURNE et al., 2008; KELLY et al., 2014; RÖTHIG et al., 2016; ZIEGLER et al., 2016; CHEN et al., 2017). Sendo assim, os micro-organismos associados aos corais podem apresentar papel fundamental na sobrevivência dos mesmos, auxiliando a sua capacidade de resiliência diante de situações de estresse (ROSENBERG et al., 2007).

A origem e a espécie do hospedeiro, seu *status* fisiológico e as condições ambientais em que eles se encontram são os principais moduladores da composição da comunidade microbiana associada aos corais (THURBER et al., 2009; HEINTZ; MAIR, 2014; AHMED et al., 2019; DEINES, HAMMERSCHMIDT & BOSCH, 2019; ESSER et al., 2019). Os micro-organismos associados a corais colonizam toda a estrutura anatômica dos hospedeiros (muco, tecido e esqueleto), sendo cada componente anatômico um micro-habitat diferente para a sobrevivência microbiana. Dessa forma, um único hospedeiro pode comportar uma grande diversidade de micro-organismos em sua estrutura (BOURNE; MUNN, 2005; AINSWORTH et al., 2015; BOURNE et al., 2016), que podem proporcionar benefícios ao coral a partir de diferentes mecanismos (PEIXOTO et al., 2017).

### **1.3 Micro-organismos benéficos para corais (BMCs)**

Diante da grande importância da relação ecológica e eco fisiológica entre corais e micro-organismos, Peixoto e colaboradores (2017) propuseram o termo BMC (Micro-organismos Benéficos de Corais – do inglês “*Beneficial Microorganisms for Corals*”) para descrever as possíveis funcionalidades dos simbiossitos de corais que contribuem benéficamente para a saúde do metaorganismo. Segundo os autores, os BMCs são micro-organismos isolados dos corais, que estariam envolvidos na proteção e manutenção da saúde dos corais, que podem ser identificados e manipulados para promover a saúde do hospedeiro e para a conservação recifal (Figura 2).

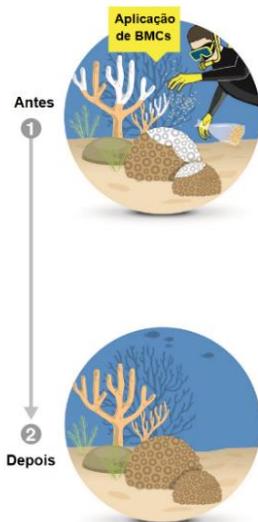
### A SELEÇÃO E MONTAGEM DE UM CONSÓRCIO BMC



### B ESTRATÉGIAS PARA APLICAÇÃO DE BMCs PARA PROTEÇÃO/RECUPERAÇÃO DE CORAIS

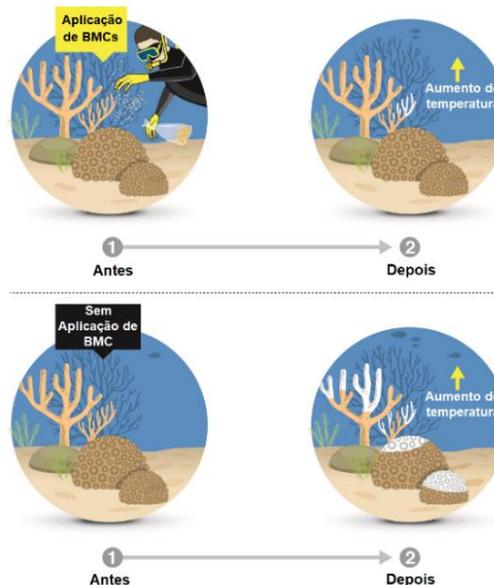
#### BIORREMEDIAÇÃO

Aplicação de BMCs em aquários e recifes APÓS um evento de branqueamento ou doença



#### PREVENÇÃO

Aplicação de BMCs em aquários ou recifes ANTES de um evento de branqueamento, guiado por alertas da NOAA



#### ASSOCIAÇÃO

Aplicação de BMCs associado à outras estratégias, visando a melhora da saúde dos corais e o aumento de resiliência

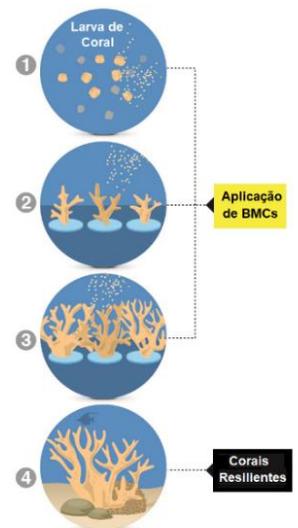


Figura 2. (A) Etapas da seleção e montagem de um consórcio com micro-organismos potenciais BMC; (B) Estratégias de aplicação de BMCs em diferentes contextos para a preservação recifal (Adaptada de PEIXOTO et al., 2017).

O termo BMC foi proposto recentemente, portanto os mecanismos que fazem com que um micro-organismo possa ser considerado um potencial BMC ainda não são inteiramente conhecidos e/ou validados. Porém, algumas características propostas como potencialmente benéficas para corais incluem: (1) realização de fotossíntese (VERBRUGGEN; TRIBOLLET, 2011; BURRIESCI et al., 2012; DAVY et al., 2012) ; (2) fixação de nitrogênio (LEMA et al., 2012; SANTOS et al., 2014; BEDNARZ et al., 2015); (3) produção de propionato de dimetilsulfônio (DMSP) (BAROTT; ROHWER, 2012); (4) degradação de DMSP (KIRKWOOD et al., 2010; RAINA et al., 2016); (5) produção de sinais mediadores do assentamento larval (RITSON-WILLIAMS et al., 2010; SHIKUMA et al., 2014); (7) produção de antibióticos e competição com patógenos (KIRKWOOD et al., 2010; ALAGELY et al., 2011;

KVENNEFORS et al., 2012); (8) produção de moléculas sinalizadoras de “quorum sensing”, tais como N-acilhomoserina lactonas (AHLs) (RITCHIE et al., 2012; CERTNER; VOLLMER, 2015; MEYER et al., 2016); (9) mecanismos que influenciam a proteção de células esqueléticas (DOMART-COULON et al., 2004); (10) produção de aminoácidos tipo micosporina (MAA) (DUNLAP; SHICK, 1998).

Cada uma dessas características BMCs pode representar uma vantagem para o metabolismo do hospedeiro, e conseqüentemente promover a saúde do metaorganismo coral. A fotossíntese, por exemplo, fornece até 90% da matéria orgânica para corais zooxantelados (TREMBLAY et al., 2012). Já a participação microbiana na ciclagem de nitrogênio está relacionada ao fornecimento de compostos nitrogenados para o coral, ou mesmo a degradação do excesso desses compostos (PEIXOTO et al., 2017). A mitigação de concentrações elevadas de espécies reativas de oxigênio (ROS) através de mecanismos microbianos (como por exemplo a produção de catalase) também é um potencial mecanismo benéfico (PEIXOTO et al., 2017). Além disso, a produção e metabolização do DMSP estão relacionadas com a ciclagem do enxofre, e com a síntese de moléculas com atividade antimicrobiana que podem inibir o estabelecimento de patógenos nos corais, protegendo-os contra possíveis infecções (BAROTT; ROWER, 2012; RAINA et al., 2016). Os microorganismos simbióticos podem ainda produzir compostos antimicrobianos e moléculas de *quorum sensing*, que podem possibilitar a comunicação celular e o controle biológico de patógenos (KIRKWOOD et al., 2010; RITCHIE et al., 2012).

O primeiro consórcio BMC desenvolvido foi testado por Rosado e colaboradores (2019) na espécie de coral *Pocillopora damicornis*, para a avaliação da saúde do coral em tratamentos utilizando-se um consórcio BMC frente ao estresse térmico (30°C) e a infecção pelo patógeno de coral *Vibrio coralliilyticus*. Os autores observaram que o tratamento com o consórcio BMC protegeu o coral não somente contra o aumento de temperatura, como também contra a infecção pelo patógeno termo-dependente *V. coralliilyticus*. Essa conclusão foi obtida através de avaliações indiretas obtidas pela taxa fotossintética das algas simbióticas associadas ao coral, e diretas, através da avaliação visual dos fragmentos, com uma diminuição parcial do branqueamento promovido pela inoculação de BMCs. Além disso, ao final do experimento, o patógeno somente pode ser detectado em corais não inoculados com o consórcio BMC, além de ter sido observado o agrupamento diferencial da microbiota em relação ao tratamento aplicado. Dessa forma, pode-se considerar que o

microbioma dos corais pode ser manipulado através do isolamento e uso de estirpes capazes de promover o aumento da saúde do coral.

Esses resultados evidenciam o grande potencial do consórcio BMC na proteção dos corais, frente à impactos causados pelas mudanças climáticas e infecções oportunistas.

O trabalho realizado por Rosado e colaboradores (2019) foi pioneiro nos estudos de manipulação microbiana de corais visando minimizar os impactos de mudanças climáticas e à patógenos. Contudo, para um maior aprofundamento no assunto, novas pesquisas precisam ser realizadas para a descobertas de novas características BMCs e suas possíveis aplicações para a proteção dos recifes de coral. Por exemplo, microrganismos que apresentem uma característica BMC que possa contribuir com o aumento da taxa de calcificação de corais, podem ser extremamente úteis na restauração de ambientes recifais degradados, tendo impacto positivo na conservação da biodiversidade marinha.

#### **1.4 Calcificação de corais**

A estrutura tridimensional característica dos recifes de coral é formada principalmente pelos esqueletos de corais calcáreos, que são sintetizados a partir do processo de biomineralização (STOLARSKI, 2003; TAMBUTTÉ et al., 2011). Dentro do filo Cnidaria, apenas 17% das espécies conhecidas produzem um esqueleto calcário (MENDOZA-BECERRIL et al., 2020). Os corais escleractíneos destacam-se devido a sua alta capacidade de calcificação, sendo responsáveis por cerca de 15% da síntese de carbonato de cálcio produzidos no planeta (MARANGONI et al., 2016). O processo de biomineralização faz com que a deposição de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) ocorra, sendo esta uma importante etapa para a formação de esqueletos carbonáticos que são fundamentais na construção e na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas recifais (DE'ATH et al., 2009; FALINI et al., 2015).

Dois processos complementares são necessários para que o crescimento do esqueleto do coral ocorra: a secreção de uma matriz orgânica e a deposição do carbonato de cálcio (GOFFREDO et al., 2011; FALINI et al., 2015). Para isso, o coral produz uma matriz carbonática, local em que ocorre a deposição de uma estrutura cristalina de  $\text{CaCO}_3$ , já que os pólipos absorvem  $\text{CaCO}_3$  da água do mar e o transferem, por difusão e bombeamento, para o local de calcificação (VAGO et al.,

1997). Em seguida, ocorre a nucleação de novos cristais, resultando em aumento da densidade esquelética (MARUBINI; THAKE, 1999).

De forma resumida, o processo de calcificação ocorre através da precipitação de carbonato de cálcio nos corais, na forma de aragonita. Os íons de  $\text{Ca}^{2+}$  e de  $\text{HCO}_3^-$  são adquiridos do meio ambiente e são alocados no sítio de calcificação, onde ocorre a reação de biomineralização, com o auxílio das células calicoblásticas, transformando-os em  $\text{CaCO}_3$  que será utilizado para a formação do esqueleto calcáreo dos corais (MARANGONI et al., 2016). As atividades bioquímicas relacionadas a calcificação dos corais requerem energia para a sua realização, e por isso, a participação dos micro-organismos simbióticos é essencial, como as zooxantelas. Esses simbiontes possuem um papel central no processo de calcificação, uma vez que são provedores de fotossintatos energéticos, oxigênio, aminoácidos, açúcares, carboidratos complexos, pequenos peptídeos (SWANSON et al., 1998) e ácidos graxos poli-insaturados (PAPINA et al., 2003). Dessa forma, processos de disbiose que afetem a relação coral-Symbiodiniaceae podem alterar a taxa de calcificação dos corais (PEARSE; MUSCATINE, 1971; CHALKER; BARNES, 1990).

Além das microalgas, outros micro-organismos associados aos corais podem impulsionar o processo de calcificação (DHAMI et al., 2013). Sabe-se que diferentes espécies bacterianas, como por exemplo *Halobacillus trueperi*, possuem a capacidade de precipitação de carbonatos através de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (RIVADENEYRA et al., 2004). Dessa forma, micro-organismos associados aos corais poderiam, hipoteticamente, possuir papel fundamental na calcificação dos corais, através do processo de biomineralização. Alguns grupos microbianos capazes de realizar a precipitação de carbonato de cálcio já foram encontrados em diferentes ambientes (STOCKS-FISCHER et al., 1999; HAMMES; VERSTRAETE, 2002).

Para realizar a busca de micro-organismos com essa função, o método do isolamento baseado na hidrólise da ureia é amplamente utilizado para a detecção da precipitação de carbonato (DHAMI et al., 2013). O protocolo tem como base a utilização de meios de cultura seletivos para o isolamento de bactérias que possuem a capacidade de hidrólise da ureia (ureólise) através da produção da enzima urease. A urease promove uma cadeia de reações químicas, que leva à formação de precipitados de carbonato de cálcio, em um processo conhecido como precipitação de calcita induzida microbiologicamente (MICP) (BHADURI et al., 2016).

O processo de calcificação, bem como outros importantes processos essenciais para a homeostase dos corais e de outros organismos calcificadores, depende de um delicado equilíbrio de compostos e fatores químicos e biológicos nos oceanos. No entanto, principalmente nas últimas décadas, esse equilíbrio tem se tornado cada vez mais difícil de ser mantido, uma vez que atividades antrópicas têm impactado fortemente as condições ambientais locais e globais. Portanto, entender esses impactos, sua origem e os principais fatores responsáveis por eles, se torna indispensável para a busca de soluções para promover o aumento de resistência e resiliência de corais frente à essas mudanças globais.

### **1.5 Impactos dos estresses ambientais nos recifes de coral**

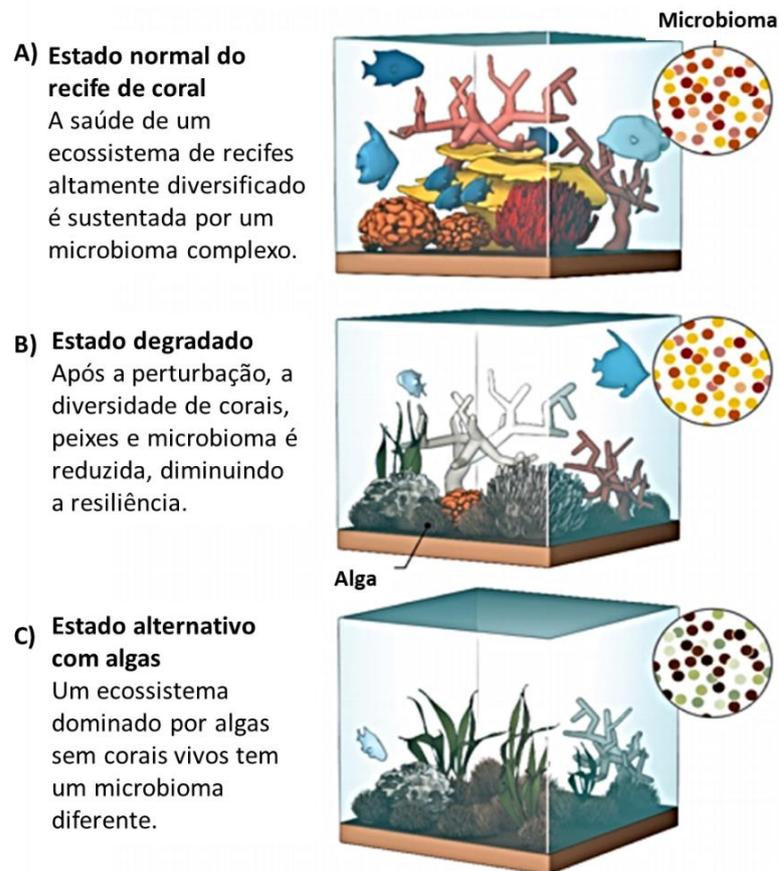
Nas últimas décadas, a comunidade científica aumentou sua preocupação acerca do futuro dos recifes de coral, devido às ameaças sofridas pelos impactos causados pelas mudanças climáticas (SULLY; VAN WOESIK, 2020), pela poluição (SANDERSON et al., 2002), pela pesca predatória (SWEET et al., 2016), pelo turismo (JUNBLUT et al., 2020), pelo transporte de petróleo (SOARES et al., 2020), pelo aumento da sedimentação (MARKEY et al., 2007) e pela coleta de corais para o aquarismo (WABNITZ; TAYLOR, 2003). A fim de mitigar os impactos das mudanças climáticas globais que ameaçam os recifes de coral (HOEGH-GULDBERG et al., 2017), diversos estudos estão sendo desenvolvidos para compreender a influência da microbiota dos corais em sua resistência e resiliência frente aos estresses ambientais (PEIXOTO et al., 2017; DEINES et al., 2019).

Dentre as principais ameaças aos recifes de coral, destacam-se a acidificação dos oceanos (ALBRIGHT et al., 2016; MANZELLO et al., 2017; MOLLICA et al., 2018) e o aumento da temperatura das águas superficiais (ZANEVELD et al., 2016; BAHR et al., 2020; NEDELJKA et al., 2020). Ambos são capazes de causar efeitos adversos diretamente nos recifes em escala global, impactando negativamente a taxa de calcificação dos corais e promovendo eventos massivos de branqueamento e mortalidade (DE'ATH et al., 2009; HERON et al., 2016; DUARTE et al. 2020). Estima-se que, na velocidade de degradação atual, os recifes de coral poderão ser extintos até o ano de 2050 (HOEGH-GULDBERG et al., 2007; BURKE et al., 2011; FRIELER et al., 2013), o que trará consequências imprevisíveis para a biodiversidade de mais de um bilhão de espécies marinhas e para a humanidade (FRIELER et al., 2013).

### 1.5.1 O aumento da temperatura dos oceanos e o branqueamento dos corais

O aumento da temperatura nos oceanos causa diversas alterações no ambiente marinho, como o aumento do nível do mar (MEEHL et al., 2005), mudanças na salinidade (ZIKA et al., 2018), oxigenação (LU et al., 2018), estratificação das massas de água (CAPOTONDI et al., 2012) e alteração na biodiversidade (MAYHEW et al., 2012). O aumento da temperatura dos oceanos pode afetar os corais de modo drástico. Um dos impactos causado pelas anomalias térmicas na água do mar é o branqueamento dos corais, que é caracterizado pela perda da associação simbiótica dos corais com algas fotossintéticas da família Symbiodoniaceae (TANAKA et al., 2014), podendo levar à morte do metaorganismo. No processo de branqueamento, a produção de quantidades excessivas de ROS e óxido nitroso pelo simbiote (CZIESIELSKI et al., 2019), causam a expulsão de dos tecidos dos corais, deixando-os sem a sua principal fonte de alimento (MORRIS et al., 2019). Além disso, durante esse processo, Symbiodoniaceae podem manter-se no coral e induzir danos celulares e/ou sequestrar recursos para seu próprio crescimento, prejudicando e parasitando o seu hospedeiro (BAKER et al., 2018; QUIGLEY et al., 2018).

Por ser a principal fonte de pigmentação no tecido dos corais, a perda de Symbiodoniaceae torna o tecido dos corais translúcido, o que originou o termo “branqueamento” (KNIPP et al., 2020). Vários estudos apontam que uma elevação de 1 a 2°C na temperatura média da água do mar local pode ser suficiente para provocar o branqueamento em diversas espécies de corais (HOEGH-GULDBERG et al., 1999; IGLESIAS-PRIETO et al., 1992; ROWAN et al., 2004; LESSER et al., 2011) (Figura 3).



**Figura 3. Etapas de degradação do ecossistema recifal com impacto das mudanças climáticas. (Adaptado de AINSWORTH et al., 2016).**

Além do branqueamento, o aumento da temperatura dos oceanos pode causar o aparecimento de outras anomalias e doenças (SWEET et al., 2012). Estudos apontam que um outro tipo de branqueamento de corais pode ser causado por agentes microbianos (KUSHMARO et al., 1996; ROSENBERG et al., 2009), e que este não deve ser confundido com o desencadeado pelos eventos de aumento da temperatura dos oceanos, apesar de ter sido sugerido que o estresse térmico pode aumentar a suscetibilidade dos corais a doenças causados por micro-organismos patogênicos e/ou oportunistas (FRANCINI-FILHO et al., 2008).

### 1.5.2. Acidificação dos oceanos

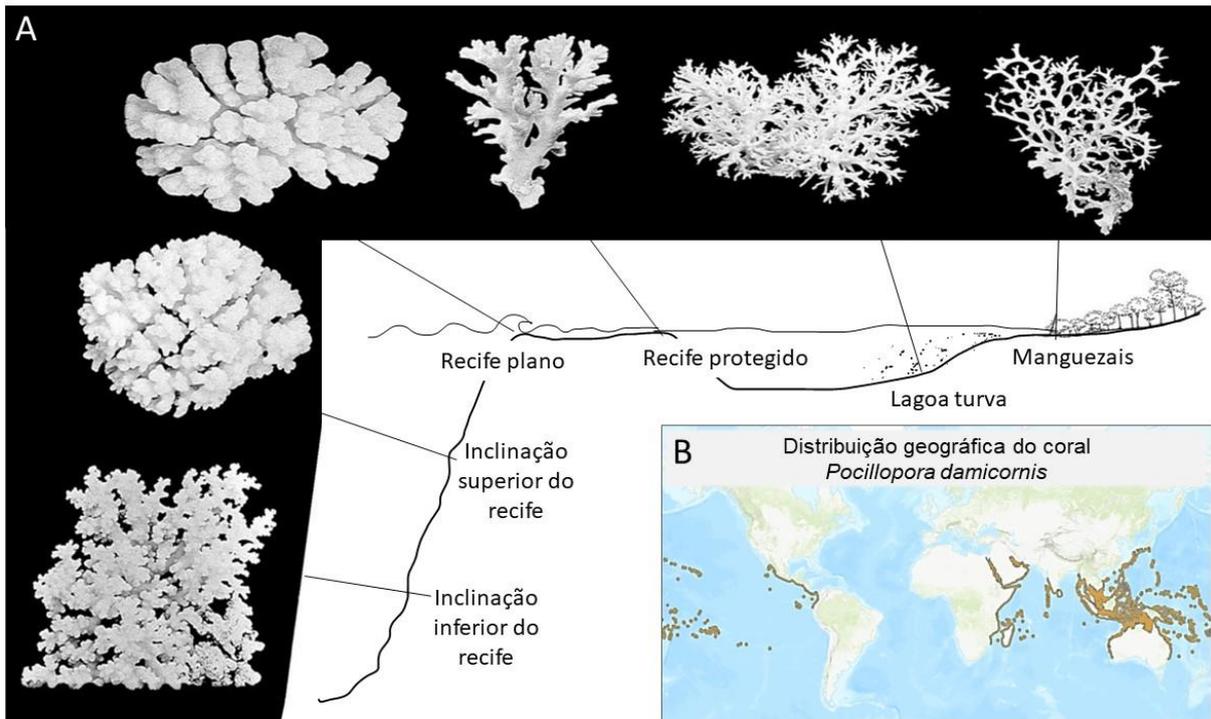
Além dos inúmeros problemas causados pelo aumento das temperaturas das águas dos oceanos, a acidificação das águas também é capaz de gerar efeitos negativos na saúde do ecossistema marinho (PANDOLFI et al., 2011). A acidificação

é um fenômeno que ocorre devido às altas taxas de concentração de CO<sub>2</sub> nos oceanos, oriundos das diferentes formas de poluição e excesso de emissões desse gás no ambiente (MARANGONI et al., 2016). Esse processo tem como principal consequência a alteração do pH da água dos oceanos, deixando-a mais ácida, podendo provocar mudanças significativas na fisiologia pelo estado de saturação da aragonita, na calcificação dos corais, na bioquímica e na estrutura dos dinoflagelados do gênero *Symbiodinium* de vida livre (HILL et al., 2019). O aumento da concentração de CO<sub>2</sub> nas águas marinhas gera um desequilíbrio nos “tampões naturais” da água (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> e HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), o que afeta diretamente a taxa de calcificação dos corais escleractíneos através da diminuição das quantidades de carbonato disponível, e consequentemente do estado de saturação da aragonita, que são essenciais na formação das estruturas de carbonato de cálcio (COHEN; HOLCOMB, 2009). Todas essas consequências adversas causadas pela acidificação e outros problemas gerados pelos impactos antrópicos gera a perda de produtividade nos corais afetados, que pode impactar de forma irreversível o ecossistema coralíneo (ANTHONY et al., 2008).

### **1.6 Coral *Pocillopora damicornis***

*Pocillopora damicornis* (LINNAEUS, 1758) é uma espécie de coral considerada cosmopolita, com uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em diversas regiões recifais desde o leste do Oceano Pacífico até a costa leste da África no Oceano Índico, no Mar Vermelho, no Golfo Pérsico e no Indo-Pacífico (VERON, 2000; HOEKSEMA et al., 2014) (Figura 4B). Esses corais podem ser encontrados em profundidades de 1 à 20m, habitando tanto os recifes oceânicos como os costeiros e os manguezais expostos, com tolerância à sedimentação e à variações de salinidade (HOEKSEMA et al., 2014), fazendo com que seja uma espécie amplamente estudada (MCLACHLAN et al., 2020).

As espécies do gênero *Pocillopora* apresentam uma plasticidade acentuada na morfologia de suas colônias (Figura 4A), variando as características fenotípicas em função do hidrodinamismo e da profundidade de ocorrência (VERON; PICHON, 1978). Podem ser encontradas em profundidades de 1 à 20m, habitando tanto os recifes oceânicos como os costeiros e os manguezais expostos, pela sua tolerância à sedimentação e às variações de salinidade (HOEKSEMA et al., 2014).



**Figura 4. (A) Variação da estrutura esquelética de *Pocillopora damicornis* em diferentes habitats. Adaptado de Veron (1976); (B) Mapa da distribuição geográfica do coral *Pocillopora damicornis* (Adaptada de “Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas” da IUCN (2020-1)).**

A taxa de crescimento de *P. damicornis* pode variar de 2,24 cm a 4,37 cm por ano (Tabela 1), e o seu habitat no recife pode causar variações no seu crescimento e em sua morfologia como mencionado anteriormente. As diferentes taxas de extensão linear entre a região anterior mais protegida, o topo recifal e a frente recifal podem possuir maior hidrodinamismo pela ação das ondas (LIZCANO-SANDOVAL et al., 2018).

**Tabela 1. Variação do crescimento linear de *Pocillopora damicornis* em diferentes regiões do leste do Oceano Pacífico.**

Local	Profundidade	Extensão linear (cm ano <sup>-1</sup> )	Referências
Ilhas Secas, Panamá	3,3–4,6	3,86 (3,39–4,33)	GLYNN et al., 1977
Ilhas Caño, Costa Rica	2–3	3,46 (2,13–4,37)	GUZMAN; CORTÉS, 1989
Recife Uva, Panamá	2–3	3,32 (3,17–3,47)	EAKIN et al., 1996
Recife Uva, Panamá	2–3	2,78 (2,40–3,30)	MANZELLO et al., 2010

Recife Saboga, Panamá	3-2	3,08 (2,55–3,61)	GLYNN et al., 1977
Ilhas Onslow, Galápagos	1–4	2,24	GLYNN et al., 1979
Golfo de Papagayo, Costa Rica	3–5	4,78 (2,8–7,56)	JIMÉNEZ; CORTÉS, 2003

**Fonte:** Adaptado de MANZELLO (2010).

O gênero *Pocillopora* possui uma identificação macromorfológica complexa (CHIAZZARI et al., 2019). Com isso, para diferenciar colônias de *Pocillopora* spp. utiliza-se a morfologia dos ramos, onde *P. damicornis* é diagnosticada pela ausência de verrugas verdadeiras (VERON; PICHON, 1978; TORRES; RAVAGO-GOTANCO, 2018). Sua coloração também pode variar em função dos pigmentos fotoprotetivos (SALIH et al., 2000), sendo a coloração típica em tons de rosa, mas também encontrados em fenótipos verdes, marrom e amarelo. Essa espécie de coral é composta de organismos liberadores de gametas, hermafroditas simultâneos, que liberam seus gametas em eventos de desova em massa (GLYNN et al., 1991). É um dos corais escleractíneos mais estudados (MCLACHLAN et al., 2020) devido a sua ampla distribuição geográfica e facilidade de coleta. Estão ameaçadas pela coleta para o aquarismo e a Indonésia é o maior exportador desta espécie de coral, com uma cota anual de 6.000 peças vivas em 2005 (UNEP-WCMC, 2014).

### 1.7 Restauração recifal

Devido ao atual estágio da degradação dos recifes de coral no mundo técnicas de restauração de corais – atividade que consiste em transplantar ou cultivar corais *in situ* ou *ex situ* em fazendas ou “viveiros” – tem recebido grande atenção de pesquisadores e “stakeholders” como ferramenta suplementar para a conservação recifal (HOEGH-GULDBERG et al., 2007). As principais práticas de restauração de recifes degradados empregadas no mundo podem ser categorizadas em dois principais critérios: restauração ativa ou passiva (EPSTEIN et al., 2003; RINKEVICH, 2005; SHAFIR et al., 2006).

A restauração ativa é baseada na intervenção humana ativa em regiões coralíneas degradadas, e vem sendo proposta em anteposição a restauração passiva que depende da regeneração natural e da interferência mínima da ação humana na recuperação recifal. As ações de restauração recifal ativas possuem vários objetivos,

como por exemplo: (1) Aceleração da recuperação recifal pós distúrbios (EDWARDS; SUSAN CLARK, 1999; EPSTEIN et al., 2003; FERSE, 2010; VAN OPPEN et al., 2015; HEIN et al., 2017); (2) Reestabelecimento funcional e autossustentável dos recifes degradados (OMORI, 2011; HUNT; SHARP, 2014); (3) Atenuação da perda de biodiversidade (ABELSON, 2006; EDWARDS et al., 2010; HUNT; SHARP, 2014; RINKEVICH, 2014); (4) Redução do declínio da população e da degradação do ecossistema, com foco em espécies ameaçadas ( EDWARDS; SUSAN CLARK, 1999; VAN OPPEN et al., 2015); (5) Oferecimento de oportunidades alternativas e sustentáveis às populações que dependem dos recifes de coral (BALL et al., 2007; EDWARDS et al., 2010; YOUNG et al., 2012); (6) Promover a governança para a conservação dos recifes de coral, incrementando as oportunidades de educação e pesquisa em cultivos para restauração (FISK; JOB, 2009; EDWARDS et al., 2010). Já a restauração passiva tem como objetivo a utilização de ações de manejo para proteção e recuperação do habitat natural em conjunto com estratégias que visam melhorar o funcionamento ecológico local, normalmente, em zonas marinhas protegidas (ZMP), que permitem a recuperação das taxas de suprimento dos sedimentos, impedindo ou modificando os usos da terra em áreas de risco (BEECHIE et al., 2003).

Diante dessas diversas medidas, a interferência humana pode ser benéfica no ecossistema coralíneo, promovendo vantagens e melhorando a resistência desses organismos frente a estresses ambientais. O coral *P. damicornis* tem se mostrado adequado para o cultivo em fazendas ou viveiros de corais, tanto *in situ* quanto *ex situ*, apresentando taxas de crescimento de 2 a 5 cm por ano (SHAFIR et al., 2006). Por sua ampla distribuição geográfica e maior tolerância a salinidade e turbidez, esta espécie vem sendo cultivada em diversas localidades dos Oceanos Índico e Pacífico (EDWARDS et al., 2010). A criação de uma fazenda de corais com características genéticas fortalecidas, como por exemplo, com a aplicação de BMCs se torna uma estratégia sustentável e interessante para o cultivo e repovoamento dos recifes de coral.

### **1.8 Heterotrofia em corais**

Os corais zooxantelados, de águas rasas, obtém a maior parte das suas necessidades metabólicas através da relação simbiótica com algas da família

Symbiodiniaceae (PAPINA et al., 2003; GROTTOLI et al., 2006), porém, os produtos fotossintéticos são deficientes em nitrogênio e fósforo (CROSSLAND, 1987) e outros nutrientes essenciais para o crescimento e reprodução, que podem ser adquiridos de forma complementar através da heterotrofia (FERRIER-PAGES et al., 2003; MORRIS et al., 2019) ou através de relações simbióticas do coral com sua microbiota associada (PEIXOTO et al., 2017).

Diversos estudos têm confirmado que muitas espécies de corais podem, de fato, ser heterotróficas e capturar organismos planctônicos (GROTTOLI et al., 2002; HOULBRÈQUE et al., 2004; HOULBRÈQUE et al., 2006; FERRIER-PAGÈS, 2009). A via heterotrófica é necessária para o crescimento máximo dos corais e pode contribuir com até 66% do carbono fixado encontrado tanto no tecido coral quanto no esqueleto (FERRIER-PAGÈS et al., 1998; HOULBRÈQUE et al., 2004; PALARDY et al., 2005). Além de fornecer carbono, a alimentação se torna importante para a maioria dos corais escleractíneos, uma vez que o nitrogênio, o fósforo e os outros nutrientes que não podem ser fornecidos pela fotossíntese das zooxantelas, podem vir da captura da microbiota, do zooplâncton, da matéria orgânica particulada ou da matéria orgânica dissolvida (BABCOCK; DAVIES, 1991; FERRIER, 1991; GROTTOLI; WELLINGTON, 1999; MORRIS et al. 2019).

A capacidade de se alimentar autotroficamente (através das microalgas simbiontes) e heterotroficamente confere aos corais a classificação de mixotróficos, o que permite uma maior capacidade de aquisição de diversos tipos de compostos na sua alimentação, com destaque para os lipídeos, que desempenham um papel essencial na nutrição e no metabolismo dos corais (CROSSLAND, 1987; PALARDY et al., 2006). Neste grupo estão os ácidos graxos, que podem ser utilizados em estudos ecológicos como marcadores tróficos (DALSGAARD et al., 2003; BACHOK et al., 2006) e como fonte de carbono para corais escleractíneos (WILSON et al., 2001; DODDS et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2012).

Através de estudos *ex situ*, comprovou-se que os corais regulam a alimentação heterotrófica quando a fotossíntese é suprimida durante eventos de branqueamento ou em maiores profundidades e/ou turvas (FALKOWSKI et al., 1984; BAIRD et al., 2009; SEEMANN, 2013; LEVAS et al., 2016). A maneira com que o coral captura a presa diferente é de acordo com a espécie: na maioria dos casos, o alimento é arrastado para o celêntero por meio de correntes ciliares (SEBENS et al., 1998), enquanto que, em alguns corais, os tentáculos transmitem o alimento diretamente

para o centro da boca (TITLYANOV; TITLYANOVA, 2002), fazendo a digestão extracelentérica (fora do corpo) (GOLDBERG, 2002).

O coral *Pocillopora damicornis*, utilizado neste estudo, é capaz de obter energia por via autotrófica e heterotrófica alimentando-se de matéria orgânica particulada (SOROKIN, 1973), bacterioplâncton (SOROKIN, 1973; FERRIER-PAGÈS et al., 1998) e zooplâncton (PALARDY et al., 2008; CONLAN et al., 2017). Dentre as espécies de zooplâncton com potencial para serem utilizadas na alimentação de corais, destacam-se os rotíferos, que apresentam diversas vantagens quando ao seu cultivo e características nutricionais.

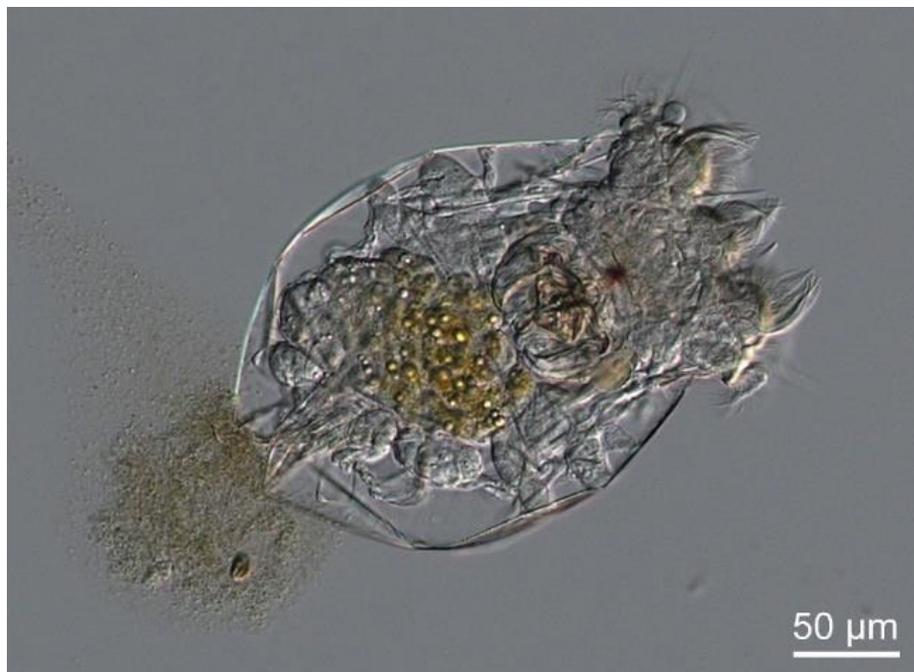
### **1.9 Rotífero *Brachionus plicatilis***

Rotíferos são animais aquáticos pertencentes ao filo Rotifera caracterizados por possuírem cílios ao redor da cavidade oral, que capturam as partículas de alimento através da rápida rotação ciliar. O filo Rotifera possui representantes em sua maioria de água doce e, em alguns casos, de água salgada, sendo fonte de alimentos para organismos planctívoros filtradores e suspensívoros, em especial para larvas de peixes e corais (HOWEY, 1999).

Os rotíferos são considerados organismos oportunistas, normalmente encontrados em ambientes com alta reserva nutricional, como reservatórios e represas de baixa salinidade, compreendendo mais de 60% do total da comunidade de zooplâncton nestes ambientes. Algumas espécies possuem tolerância aos estresses ambientais, como é o caso de *Brachionus plicatilis*, que se mostrou mais resistente à contaminação por mercúrio do que o *Proales similis* (REBOLLEDO et al., 2018). Esses organismos podem ser utilizados como bioindicadores em regiões com constante ação humana, pela sua capacidade de resposta aos impactos antrópicos (RODRÍGUEZ et al., 2000).

Os rotíferos são nadadores lentos, estáveis na coluna d'água (HOWEY, 1999) e possuem diversos tamanhos, que geralmente variam de 100 a 500  $\mu\text{m}$  de comprimento. Entretanto, rotíferos de 50  $\mu\text{m}$  e até 2000  $\mu\text{m}$  também são eventualmente observados, o que destaca a sua grande diversidade morfológica (FU et al., 1991; MILLS et al., 2017) (Figura 5). Estes animais podem ser cultivados em grandes densidades, pois possuem rápida capacidade de reprodução e ainda podem

ser enriquecidos com substâncias importantes para o desenvolvimento de cultivo dos animais, como ácidos graxos e/ou antibióticos, necessários para crescimento e sobrevivência de larvas de peixes (LUBZENS et al., 1989) em um processo conhecido como bioencapsulação (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2003). Por estes motivos, os rotíferos são amplamente usados como fonte de alimento vivo de animais da aquicultura, devido ao seu fácil cultivo e possibilidade de bioencapsulação de substâncias interessantes para o cultivo e a saúde dos animais (TOWLE et al., 2015). Uma das principais espécies de rotíferos presentes no ambiente marinho, e utilizada constantemente na aquicultura, é a *Brachionus plicatilis* (Figura 5).



**Figura 5. Fotomicrografia ótica do rotífero *Brachionus plicatilis* utilizado neste estudo obtida pelo microscópio Zeiss Axioimager (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) (Imagem de própria autoria).**

Esta espécie é considerada como um dos primeiros alimentos dos peixes em sua fase larval (LUBZENS et al., 1989), uma vez que são amplamente encontradas nos oceanos e possuem uma maior tolerância às variações que ocorrem no ambiente marinho, como a capacidade de sobreviver em ambientes salinos com alteração de 20 a 35 ppm de salinidade. (LUBZENS et al., 1985). Além disso, essa espécie de rotífero possui uma diversidade críptica, devido a seus níveis elevados de plasticidade fenotípica distribuída globalmente nos ambientes naturais (MILLS et al., 2017).

### 1.10 Bioencapsulação do BMC pelo rotífero

Os rotíferos, principalmente pertencentes ao gênero *Brachionus*, são usados como organismos de alimentação viva na aquicultura desde a década de 1970 (LUBZENS et al., 2001) já que pequenas larvas marinhas necessitam de diminutas presas durante as fases iniciais da vida (CONCEIÇÃO et al., 2010). Dessa forma, os rotíferos podem ser a principal alimentação viva empregada em cultivos marinhos pois: (1) têm um tamanho adequado para a maioria das larvas marinhas, (2) podem ser cultivadas em altas densidades, (3) têm uma alta taxa reprodutiva, (4) têm uma alta tolerância a temperatura e à salinidade, (5) nadam lentamente e (6) são filtradores (LUBZENS, 1987; MAKRIDIS et al., 2000)

Em geral rotíferos apresentam teores lipídicos de 9-28% do peso seco, dos quais 34-43 % são fosfolipídios e 20-55 % de triacilglicerol (LUBZENS; ZMORA, 2003), sendo uma fonte de alimento com grande quantidade de nutrientes para serem utilizados no metabolismo energético dos animais Além dos rotíferos serem um rica fonte de nutrientes, eles ainda possuem um microbioma associado, que pode estar relacionado com a produção de vitamina B12 que pode ser absorvida pelos rotíferos e até mesmo por seu predador (MARUYAMA; HIRAYAMA, 1993; VAN DER MEEREN et al., 2008)

A cultura de *Brachionus plicatilis* possui em suas cavidades gastrointestinais uma complexa comunidade bacteriana (VERDONCK et al., 1994), sendo considerado uma fonte importante de bactérias para as larvas de peixe e outros organismos em cultivo (VERDONCK et al., 1994). Como parte do primeiro alimento desses seres vivos, as bactérias associadas aos rotíferos podem modificar a flora intestinal presente durante os estágios larvais iniciais (MUROGA et al., 1987; NICOLAS et al., 1989) e, ainda melhorar o valor nutricional deste alimento (GATESOUBE, 1991).

O processo de bioencapsulação dos rotíferos com bactérias que apresentem potenciais características benéficas para os organismos-alvo (aqueles que se alimentam dos rotíferos), é um mecanismo promissor. Assim, os probióticos seriam transmitidos via oral para os corais, bem como já é estabelecido para outras espécies marinhas (VINE et al., 2006), podendo potencialmente atingir diferentes nichos do microbioma do organismo hospedeiro.

## 2. JUSTIFICATIVA

Diante da importância biológica e socioeconômica dos recifes de coral, a criação de estratégias que visam o aumento do crescimento, da resistência e resiliência dos corais são de grande valia para a proteção desse ecossistema marinho frente às mudanças globais. Assim, o desenvolvimento de metodologias capazes de aprimorar as técnicas de cultivo e alimentação de corais são essenciais para garantir a saúde desses organismos ameaçados pelos impactos antrópicos (BRUNO et al., 2019).

Os corais de água rasa podem obter até 90% de sua fonte de carbono e energia através dos fotossintetizantes oriundos da sua simbiose com dinoflagelados da família *Symbiodiniaceae* (MUSCATINE et al., 1990). Todavia, alguns estudos demonstram que a alimentação heterotrófica dos corais aumenta a sua taxa de calcificação e conseqüentemente o seu crescimento (HOULBRÈQUE et al., 2003). A alimentação de corais com pólipos pequenos, como a espécie *Pocillopora damicornis*, pode ser realizada através de rotíferos, que podem ser enriquecidos com bactérias probióticas para o organismo por ele alimentado (MARTÍNEZ-DÍAZ et al., 2003).

Nesse sentido, Rosado e colaboradores (2019) desenvolveram um consórcio microbiano composto por 7 estirpes sendo, 5 isolados de *Pseudoalteromonas sp*, 1 isolado de *Cobetia marina* e 1 isolado de *Halomonas sp*. Em experimento de curto prazo em mesocosmo, o tratamento com BMCs protegeu os corais contra estresse térmico em conjunto com a exposição ao patógeno *V. coralliilyticus*.

Apesar de ter obtido sucesso na proteção do coral em tais condições, novos questionamentos surgiram ao final do experimento, como por exemplo se esse consórcio poderia influenciar a taxa de crescimento/calcificação dos corais a longo prazo, e como a entrega desses probióticos poderia ser otimizada. Sendo assim, a proposta desse estudo foi avaliar a capacidade dos isolados obtidos por Rosado e colaboradores (2019) em hidrolisar a ureia através da produção da enzima urease.

Além disso, foi desenvolvido e avaliado um novo método de carreamento do consórcio BMC para os corais baseado em heterotrofia através do uso de rotíferos. O novo método de carreamento desenvolvido poderá contribuir para futuros estudos de otimização do cultivo de corais, com a inoculação de rotíferos enriquecidos com BMC, a fim de acelerar o crescimento de corais. Essa abordagem será testada no sistema experimental também desenvolvido como parte das pesquisas realizadas no presente trabalho.

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo geral

Os objetivos gerais deste trabalho foram avaliar o potencial de bactérias isoladas do coral *P. damicornis* já descrito anteriormente na atividade da enzima urease e desenvolver um protocolo de carreamento desse consórcio BMC e, ainda, desenvolver um sistema experimental para futuros testes com esse consórcio BMC.

#### 3.2 Etapas desenvolvidas

- Verificar a capacidade de precipitação de carbonato de cálcio do consórcio BMC desenvolvido por Rosado e colaboradores (2019);
- Avaliar a capacidade do rotífero *Brachionus plicatilis* em bioencapsular o consórcio BMC estudado;
- Avaliar a presença das bactérias que compõe o consórcio BMC dentro dos rotíferos;
- Testar a capacidade do coral *Pocillopora damicornis* em se alimentar do rotífero *Brachionus plicatilis*;
- Desenvolver um sistema experimental para futuramente testar o impacto da alimentação heterotrófica dos corais através da veiculação de BMC bioencapsulado em rotíferos na biomineralização de corais;
- Validar o sistema experimental com a avaliação dos parâmetros físico-químicos.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Avaliação da atividade da enzima urease por BMCs previamente selecionadas

Os micro-organismos oriundos do coral *Pocillopora damicornis* previamente isolados pelo trabalho realizado por Rosado e colaboradores (2019) foram testados quanto a sua capacidade de hidrolisar ureia através da atividade da enzima urease.

Os micro-organismos previamente isolados por Rosado e colaboradores (2019) consistiam em cinco estirpes de *Pseudoalteromonas* sp., uma estirpe de *Halomonas* sp. e 1 estirpe de *Cobetia marina*. O estoque de cada isolado bacteriano foi reativado em meio *Marine Broth* 2216 (500g) da Interlab (inóculo de 10 µL em 5 ml de meio líquido), com incubação a 28°C por 24 horas. Um total de 10µL de cada cultura foi adicionada em placas de Petri, através da técnica de estria composta.

O meio urease possui a composição de 1g de peptona, 1g de dextrose, 5g de cloreto de sódio, 2g de fosfato monossódico, 20g de ureia, 12mg de vermelho de fenol e 15g de ágar, com pH final de 6,8 (CHAHAL et al., 2011). Neste meio, a incubação foi de até 48 horas a 28°C.

### 4.2 Preparo do consórcio BMC

O consórcio BMC utilizado neste trabalho para avaliar a capacidade de bioencapsulação pelo rotífero foi o desenvolvido anteriormente por Rosado e colaboradores (2019). Esse consórcio é composto por sete estirpes bacterianas, identificadas como: *Pseudoalteromonas* sp. (KP016625.1) (BMC1) (99%), *Pseudoalteromonas* sp. (KU955357.1) (BMC2) (100%), *Pseudoalteromonas* sp. (KX806641.1) (BMC3) (100%), *Pseudoalteromonas* sp. (KX806641.1) (BMC4) (99%), *Pseudoalteromonas* sp. (KU955357.1) (BMC5) (99%), *Cobetia marina* (KP236304.1) (BMC6) (99%), *Halomonas taeanensis* (KJ161492.1) (BMC7) (100%). Todas as bactérias do BMC foram isoladas em meio marine e identificadas através de PCR para genes de *nirK* (redução de nitrato), *nirfH* (fixação do nitrogênio atmosférico), *dmdA* (degradação de DMSP) e testes bioquímicos para atividade da catalase (decomposição do peróxido de hidrogênio) e, com isso foram selecionados os isolados *Pseudoalteromonas* sp (positivo para *nirK*, *nirfH* e catalase), *Cobetia marina* (positivo

para catalase) e *Halomonas sp* (positivo para genes de *nifH* e catalase) (ROSADO *et al.*, 2019).

O protocolo para a produção do consórcio BMC foi descrito em seu artigo e compõe as seguintes etapas: ativação dos isolados bacterianos, crescimento em maior escala e preparação do inóculo BMC.

As estirpes escolhidas para fazerem parte do consórcio foram primeiramente cultivadas em meio marinho sólido (28 °C por 48 h) para avaliação de pureza e obtenção de colônias isoladas. Posteriormente, uma colônia pura foi inoculada em 5 ml de meio marinho broth, que foi incubado sob agitação de 100 rpm a 28 °C, por 48 h. Afim de se obter uma biomassa celular bacteriana para ser utilizada como inóculo, as estirpes foram crescidas separadamente em 100 ml de meio MB 3% dentro de Erlenmeyers de 250 ml e incubadas sob agitação de 100 rpm a temperatura de 28°C por 24 horas. Esse período de incubação corresponde a concentração de bactérias de  $10^{-7}$  células por ml que foi utilizado como padrão para inóculo do consórcio BMC. A partir disso, as células crescidas foram colocadas em tubos falcon de 50 ml e lavadas três vezes com água salina estéril (0.85% g/v de NaCl) para a eliminação de resíduos do meio de cultura. Todas as células de cada cultura bacteriana foram colocadas em um mesmo tubo falcon de 50 ml para a serem homogeneizadas e ressuspensas em um volume final de 100 ml de salina (concentração final de  $10^7$  bactérias/ml) e estocadas a 4°C até seu uso no experimento.

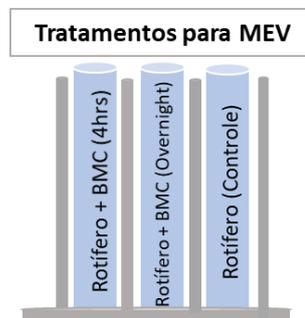
### **4.3 Bioencapsulação do rotífero *Brachionus plicatilis* com BMC**

#### **4.3.1 Avaliação da viabilidade do BMC no rotífero através de Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV)**

Os rotíferos da espécie *Brachionus plicatilis* foram coletados nas águas de reservatório do biotério localizado no Aquário Marinho do Rio de Janeiro. Neste biotério, os rotíferos crescem em garrafas de vidro com 5L de água, contendo cerca de 100 rotíferos por ml. Para identificação da espécie do rotífero, utiliza-se uma lupa binocular Zoom da Digilab. Para o experimento, os rotíferos foram coletados com o auxílio de um frasco plástico estéril de 500 ml e filtrada em filtro de malha de poliéster com porosidade de 10 µm. Os rotíferos foram capturados através da filtração e levados para o Laboratório de Ecologia Microbiana Molecular (LEMM) através dos frascos de 500ml como mencionado anteriormente, na temperatura de 24°C e com

aeração através de um aerador a pilha. No laboratório, os rotíferos passaram novamente pela peneira de 10  $\mu\text{m}$  e foram transportados para um Becker de 250ml contendo de água do mar filtrada com membrana de 0,25  $\mu\text{m}$  e esterilizada através de aquecimento para eliminar qualquer microrganismo que seja predador do rotífero ou alguma possível microalga que possa ser utilizada pelo rotífero para sua própria alimentação (temperatura da água foi de 24 °C no momento da inserção do rotífero). Para quantificar o número de rotíferos, utilizou-se uma lupa para a visualização e a contagem do número de rotíferos presentes ocorreu em 1ml da água, em triplicata. O frasco foi acondicionado a uma temperatura de 24°C e salinidade de 32ppm.

Para inocular o BMC nos rotíferos, cerca de 300 rotíferos foram utilizados e distribuídos em três frascos de 100 ml contendo água do mar filtrada com membrana esterilizada de 0,25 $\mu\text{m}$ . Uma lupa foi utilizada para a contagem dos rotíferos por mL, mantendo-se uma média de 100 rotíferos por frasco. Esses rotíferos permaneceram sete dias em jejum para evitar qualquer contaminação por microalga que interferisse nas análises. Em seguida, os cultivos de rotíferos sofreram lavagens sucessivas através da troca da água por uma nova filtrada e esterilizada a cada 3 dias. Posteriormente, inoculou-se 100 $\mu\text{L}$  de cada bactéria do consórcio BMC, previamente marcadas com Kit de viabilidade bacteriana Live/Dead BacLight (Invitrogen) na cultura de rotíferos, permanecendo durante a noite (*overnight*) e, no dia seguinte, inoculou-se 4 horas antes do preparo da amostra para MEV. Dessa forma, foram preparados 3 tratamentos para a observação dos rotíferos em microscopia eletrônica de varredura: (1) rotíferos + BMC com 4 horas de interação; (2) rotíferos + BMC em *overnight*; e (3) rotíferos sem BMC, que representa o tratamento controle (Figura 6).



**Figura 6. Esquema mostrando os tratamentos feitos para obter as imagens em Microscopia Eletrônica por Varredura (MEV).**

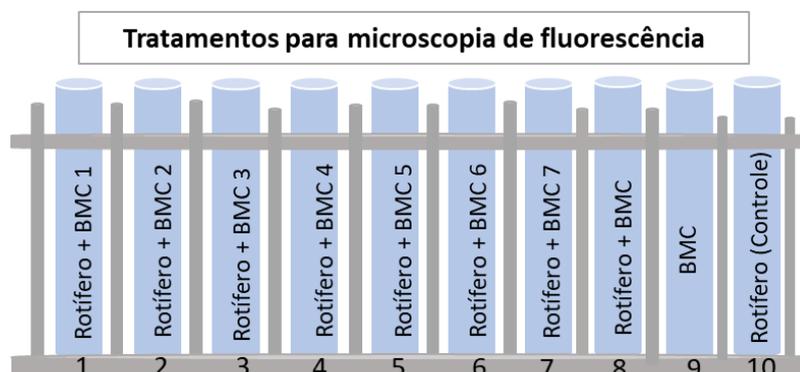
O tratamento dessas amostras para MEV ocorreu no laboratório UniMicro do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ). Para isto, cápsulas “beem” modificadas com filtro de malha de poliéster de 100 µm foram utilizadas para iniciar o procedimento de tratamento amostral para MEV. Após esse período, o rotífero foi fixado em 2,5% glutaraldeído e 0,1M tampão de cacodilato de sódio por 1h, depois lavado três vezes com solução tampão de cacodilato de sódio de 0,1M e água do mar estéril. A desidratação ocorreu com etanol (30, 50, 70, 90 e 100% de concentração) por 10 minutos cada e 3x na última concentração. Para garantir a remoção completa da água no ponto crítico usou-se dióxido de carbono, e depois foi montada em um "Stub" com fita de carbono de dupla face para metalização (AMSELLEM; CLEMENT, 1980). As imagens foram feitas pelo microscópio eletrônico de varredura EVO MA10 com tensão entre 1 - 30 kV, que é capaz de trabalhar em alta pressão (10<sup>-2</sup> a 10<sup>-4</sup> Pa) e pressão variada (10 a 400 Pa) (Zeiss, CenaBio, Rio de Janeiro, Brasil), localizadas no CenaBio da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no intuito de visualizar a bioencapsulação das bactérias pelos rotíferos.

#### 4.3.2. Avaliação da viabilidade do BMC no rotífero através da Microscopia de fluorescência

Para analisar a interação do rotífero com cada bactéria do consórcio BMC, foi seguido o mesmo protocolo de preparação do rotífero para MEV, como descrito anteriormente. O protocolo de alimentação dos rotíferos com as bactérias do consórcio previamente marcadas com Kit de viabilidade bacteriana Live/Dead BacLight (Invitrogen) de acordo com o protocolo do fabricante, foi desenvolvido neste experimento junto ao laboratório LabMax e UniMicro presentes no Instituto de Microbiologia Paulo de Góes (UFRJ).

Esta técnica de marcação por fluorescência permite a observação exata da localização das bactérias estudadas em diferentes locais no corpo do rotífero, podendo ser vista interna ou externamente, através de imagens obtidas pelo Microscópio Zeiss Axioimager (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), equipado para contraste de interferência diferencial e microscopia de fluorescência e localizado no laboratório UniMicro. Para essa análise, foram feitas as seguintes análises: (1-7) a

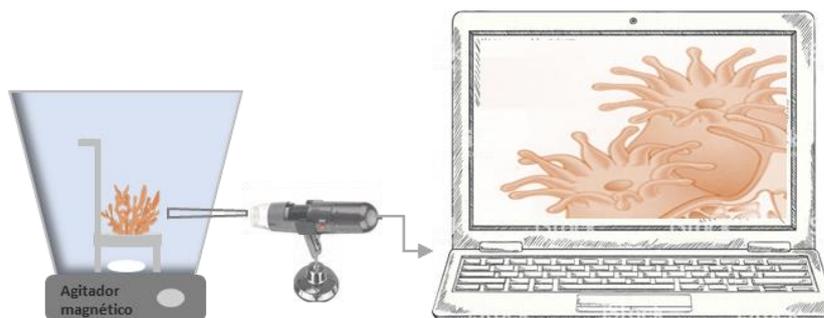
interação de cada bactéria do BMC com o rotífero, (8) análise do consórcio BMC interagindo com o rotífero, (9) somente o BMC e (10) o rotífero sem BMC (controle), totalizando 10 tratamentos (figura 7).



**Figura 7.** Esquema apresentando os tratamentos para analisar a interação de cada bactéria e do consórcio BMC com o rotífero *Brachionus plicatilis* usando Microscopia de fluorescência. Tratamentos com cada bactéria do consórcio BMC (1 a 7), seguindo com o tratamento do rotífero com BMC (8), somente com BMC (9) e com rotífero sem BMC (controle) (10).

#### 4.4 Alimentação do coral *Pocillopora damicornis* com o rotífero *Brachionus plicatilis*

Para avaliar se a espécie de coral *Pocillopora damicornis* é capaz de se alimentar heterotroficamente com rotíferos da espécie *Brachionus plicatilis*, um fragmento de coral da espécie em estudo com cerca de 10 cm de tamanho foi acondicionado em um aquário de 30L, com a circulação realizada através de um mini agitador magnético (Hanna, HI190M-1) e utilizou-se um suporte para permitir que a barra magnética pudesse movimentar a água e fazer com que os pólipos (diâmetro de 1mm) ficassem abertos para captura dos rotíferos (tamanho variando de 50µm a 2mm). Foi adicionado ao aquário 200 ml da cultura de rotíferos obtido no biotério do AquaRio e seguindo o protocolo de esterilização da água em todo o procedimento. Durante todo o processo, o mini microscópio digital (Digital USB Microscope, Alloet, China), com zoom de 1000x e com câmera de 2,0 Mp, fez imagens e vídeos do coral capturando os rotíferos (Figura 8).



**Figura 8. Ilustração esquemática da metodologia aplicada para a análise da captura do rotífero *Brachionus plicatilis* pelo coral *Pocillopora damicornis*.**

#### 4.5 Desenvolvimento do sistema experimental

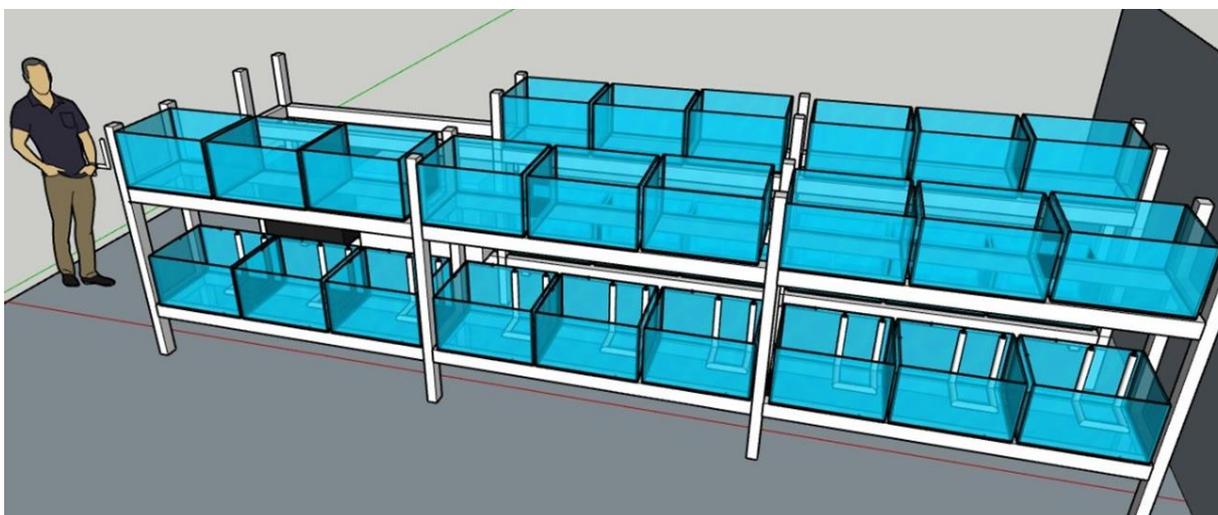
Para a realização de futuros experimentos do BMC bioencapsulado pelo rotífero e a avaliação desta forma de alimentação para o coral *P. damicornis*, um sistema experimental foi projetado e desenvolvido no Aquário Marinho do Rio de Janeiro (AquaRio). Esse novo sistema é composto de dezesseis aquários retangulares (50cm x 50cm x 60cm, 8mm de espessura nos vidros), 150L de capacidade bruta e 140L de capacidade líquida (figura 9). Além disso, foram produzidos dezesseis *sumps* (um para cada aquário) de 60cm x 50cm x 30cm, 90L de capacidade, com preenchimento de 60L e vidros de 8mm de espessura. Os *sumps* são aquários utilizados para abrigar o sistema de refrigeração, filtração e bombas de retorno de água. Cada aquário foi projetado como uma réplica independente dos demais, permitindo a livre variação dos parâmetros ambientais e evitando qualquer pseudo-replicagem e artefatos de método (HEFFNER et al., 1996; HURLBERT, 1984).

Para manter os corais em um ambiente com temperatura estável, foi desenvolvido um sistema de refrigeração empregando serpentinas com canos de PVC para refrigerar a água através de um *chiller*. Neste sistema, a água doce gelada fica armazenada em três caixas de 50L. Para circular essa água em todo o sistema, uma bomba centrífuga tipo “powerhead” de 1000L/h (Sarlo Better 1000, Rio de Janeiro) foi instalada para bombear essa água para um cano PVC de espessura de 100 mm que possui as bombas Better 1000, uma para cada aquário réplica, conectadas em um termostato de precisão (TIC-17RGTI, FullGauge, Canoas) que controla a temperatura de cada aquário de forma independente. Essa água flui pela serpentina de cano PVC

presente em cada *sump* e, através de troca térmica, refrigera o sistema e mantém a temperatura em 25°C.

Bombas centrífugas do tipo “powerhead” de 2000 L/h (Sarlo Better 2000, Rio de Janeiro) foram utilizadas para transportar a água do *sump* para o aquário, enquanto duas bombas de circulação (modelo JVP-200a 5000 L/h e RS-108A 3000L/h) foram instaladas em cada aquário, totalizando 8000L/h de circulação interna total em cada aquário réplica.

No intuito de manter a incidência luminosa similar ao ambiente marinho, um oscilador de intensidade luminosa foi utilizado nas luminárias LED com o objetivo de reproduzir as variações diárias encontradas em recifes típicos. O fotoperíodo foi ajustado das 07:00h às 17:00h com 10h de período luminoso e 14h de período escuro. Para o controle da intensidade da luz e a variação circadiana, foi utilizado “control led32v” do software Arduino (versão 1.8.10, <https://www.arduino.cc/>), que foi configurado em parceria com o Centro de Pesquisas do Aquário Marinho do Rio de Janeiro. O medidor de luz LI-250 A LI-COR foi utilizado para acompanhar a curva de luz e as alterações que ocorreram durante o fotoperíodo.



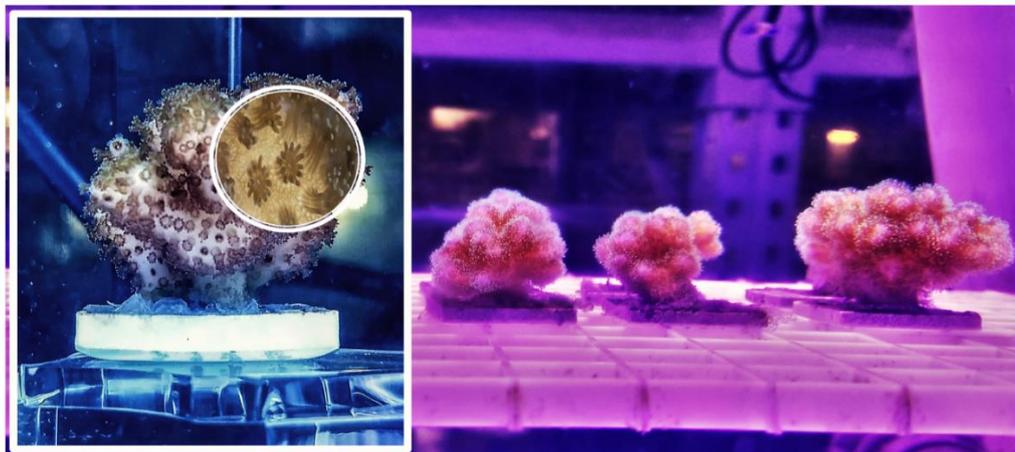
**Figura 9.** Representação esquemática do sistema experimental feita no Sketchup apresentando os dezesseis aquários na parte superior das prateleiras, os dezesseis *sumps* presentes na parte inferior. A passagem de água gelada ocorre dentro dos canos de PVC que ficam no *sump* (canos brancos).

## 4.6 Validação do sistema experimental

### 4.6.1 Aclimação da *Pocillopora damicornis* no sistema experimental

Para o desenvolvimento do experimento, utilizou-se o coral *Pocillopora damicornis* com fenótipo de pigmentação fotoprotetiva (GFP) verde e rosa (tamanho

aproximado de 5 cm), obtido através de fazendas de cultivo de corais, localizada em Fortaleza, Ceará. Os corais foram aclimatados por 10 dias no sistema experimental, onde cada aquário recebeu 10 fragmentos de corais, totalizando 160 fragmentos nas 16 réplicas experimentais (figura 10).



**Figura 10.** Imagem de fragmento de colônia de *Pocillopora damicornis* nos aquários experimentais, apresentando suas ramificações e coloração (Própria autoria).

#### 4.6.2 Validação do sistema experimental através do $F_v/F_m$ e dos parâmetros físico-químicos

A validação do sistema experimental foi avaliada através da (i) quantificação do índice de rendimento quântico fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) das zooxantelas associadas ao coral; (ii) Análise dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários.

##### (i) Quantificação da capacidade fotossintética do *Symbiodinium spp.*

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (FSII) ( $F_v/F_m$ ) das zooxantelas associadas ao coral, que quantifica a sua capacidade fotossintética, foi mensurado utilizando fluorômetro subaquático de pulso e amplitude modulada (Diving-PAM (Heinz Walz GmbH, Effeltrich), ajustado com a seguinte configuração: “*Measuring Light Intensity*” (MI) = 5; “*Saturation Pulse Intensity*” (SI) = 8; “*Saturation Pulse Width*” (SW) = 0,8; “*Gain*” (G) = 1; “*Damping*” (D) = 1. A intensidade da radiação fotossinteticamente ativa (PPFD) dentro de cada recipiente do coral foi medida usando um sensor quântico de fibra óptica com diâmetro de 8mm, conectado ao Diving-PAM.

Para iniciar a análise dos valores de fluorescência, cada amostra de coral permaneceu no escuro por uma hora (*dark adaptation*) para a obtenção

rendimento quântico máximo do FSII, seguindo os valores de fluorescência denominados de  $F_v/F_m$  (HILL; RALPH, 2005).

(ii) *Análise dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários*

Os parâmetros físico-químicos analisados foram amônia ( $\text{NH}_4$ ), nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), salinidade e pH, semanalmente; e iodo ( $\text{I}^-$ ), potássio, dureza carbonatada (KH) (alcalinidade da solução) e fosfato ( $\text{PO}_4$ ), quinzenalmente. As análises foram feitas utilizando kits da marca “Sera”, com exceção dos testes de potássio e iodo que foram feitos pelos kits da marca “RedSea”. Todos seguiram as especificações do fabricante. Os dados para os parâmetros físico-químicos foram coletados em quatro diferentes grupos de replicatas biológicas para melhor compreensão e comparação dos valores: grupos de replicatas 1 (aquário 2, aquário 9, aquário 12 e aquário 14), grupos de replicatas 2 (aquário 4, aquário 7, aquário 11 e aquário 15), grupo de replicatas 3 (aquário 1, aquário 6, aquário 8 e aquário 13) e grupos de replicatas 4 (aquário 3, aquário 5, aquário 10 e aquário 16). As coletas foram realizadas em quatro tempos, nas respectivas datas: 27 de novembro 2019, 11 de dezembro 2019, 18 de dezembro 2019, 26 de dezembro 2019, 8 de janeiro 2020 e 22 de janeiro de 2020.

Os gráficos foram gerados em *script* desenvolvido na linguagem R versão 3.6 (R Core team) com o pacote ggplot2 (WICKHAM, 2016). As análises estatísticas foram feitas no pacote ggpubr v0.2.3 e função *stat\_compare\_means*. Para avaliar se existe diferença significativa entre as médias dos parâmetros físico-químicos obtidos nos grupos de replicatas, foi realizado o teste ANOVA em cada tempo de coleta. A análise estatística de rendimento fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) foi realizada com o Test T ( $p > 0.05$ ).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Seleção e identificação de potenciais BMCs para o processo de calcificação

O teste da urease com o consórcio BMC previamente selecionado por Rosado e colaboradores (2019) evidenciou que, três estirpes de *Pseudoalteromonas* sp. (BMC1, BMC2, BMC3) e uma *Halomonas* sp. (BMC7) testaram positivos para a produção desta enzima (figura 11).

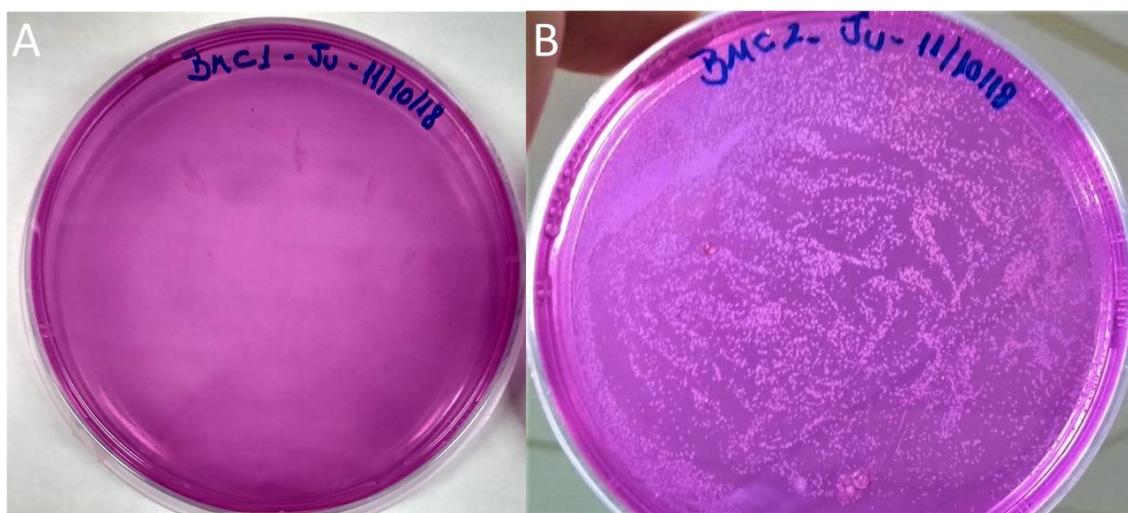
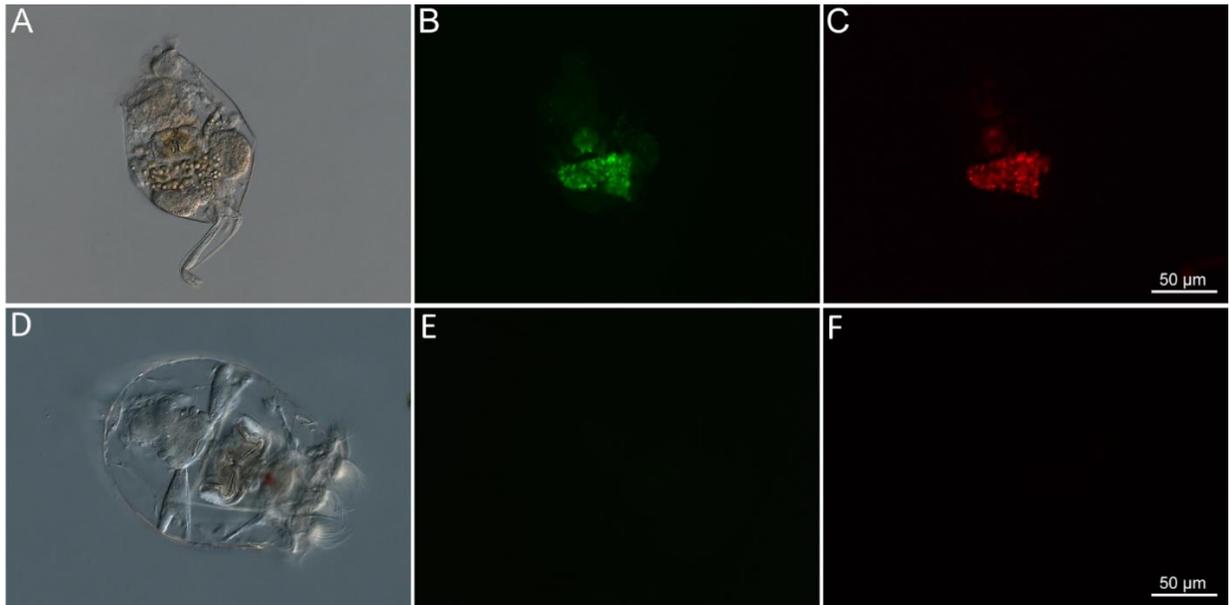


Figura 11. Meio de cultura plaqueado que foi utilizado no estudo com crescimento das BMCs previamente selecionadas por Rosado e colaboradores (2019). (A) Meio urease com uma *Pseudoalteromonas* sp (BMC1) com alteração na coloração da placa; (B) Meio urease com uma *Pseudoalteromonas* sp (BMC2) com alteração na coloração da placa e crescimento de colônias.

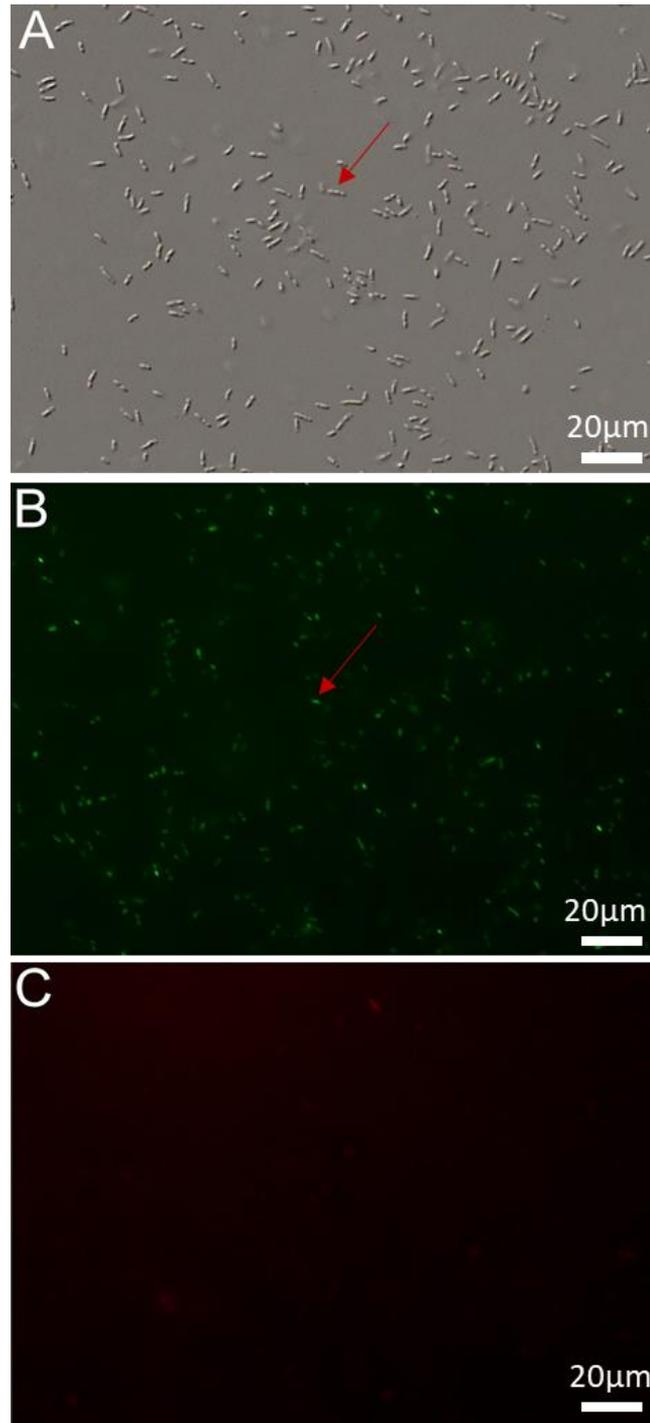
### 5.2 Bioencapsulação do BMC pelo rotífero *Brachionus plicatilis*

As imagens feitas pelo microscópio de fluorescência mostraram a fotomicrografia do rotífero sem BMC (figura 12A). A autofluorescência em seu interior se refere a presença de microalgas em seu interior que foi vista com filtro de luz verde (figura 12B) e filtro de luz vermelho (figura 12C). Ao deixar o rotífero em jejum por 7 dias, a autofluorescência não ocorreu nem no filtro de luz verde (figura 12E) quando no filtro de luz vermelho (figura 12F), viabilizando assim o teste de enriquecimento do rotífero por bioencapsulação com bactérias marcadas.



**Figura 12.** Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis*. (A) Cultura a fresco apresentando a morfologia do rotífero alimentado; (B) Visualização da autofluorescência, com filtro para fluorescência verde (C) Visualização da autofluorescência, com filtro para fluorescência vermelha; (D) Cultura a fresco apresentando a morfologia do rotífero em jejum; (E) ausência de autofluorescência, com filtro para fluorescência verde; (F) ausência de autofluorescência, com filtro para fluorescência vermelho.

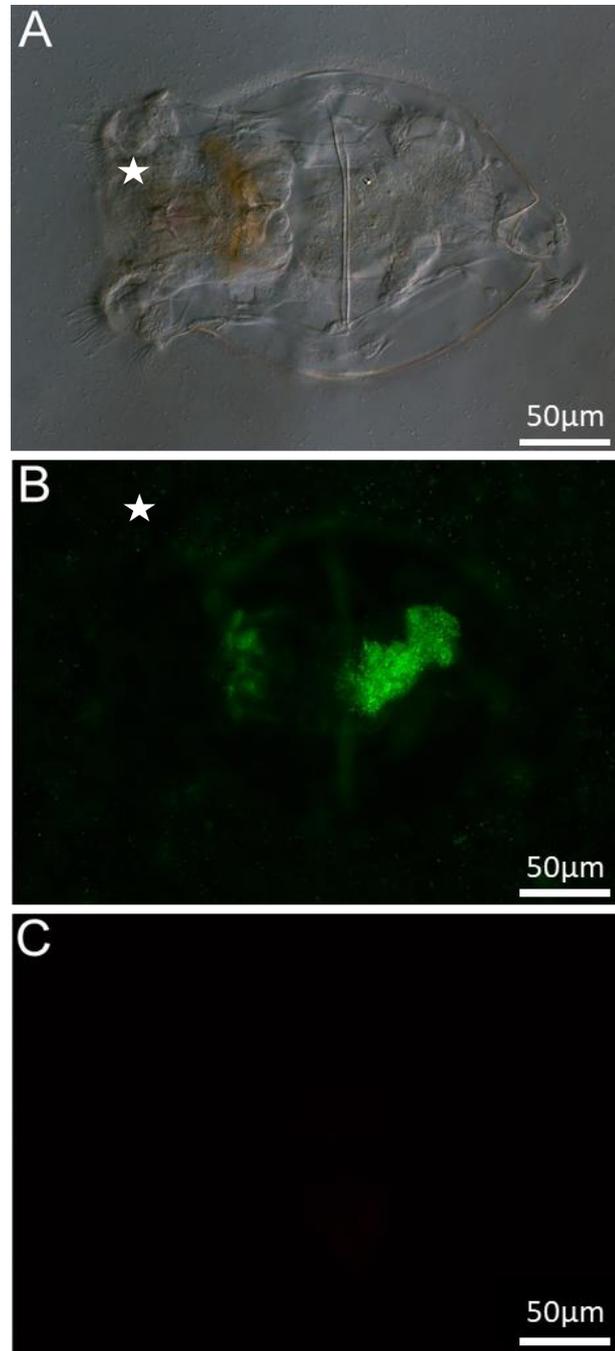
A viabilidade das bactérias que compõe o consórcio BMC foi sugerida através da visualização das células marcadas com o corante Live/Dead (Figura 13ABC). Na figura 13A, pode-se observar a presença das células bacterianas do BMC; na figura 13B, a cor verde indica que as células coradas com SYTO 9 estão saudáveis e a ausência de células na figura 13C, sugere que não há células mortas ou danificadas, de acordo com a marcação com Iodeto de propídio.



**Figura 13. Fotomicrografia das bactérias do consórcio BMC com diferentes marcações, visualizadas pelo microscópio Zeiss Axio Imager. (A) O BMC sem corante fluorescente; (B) O BMC marcado com o corante SYTO 9, que fluoresce em verde as células saudáveis; (C) O BMC marcado com iodeto de propídio. A o que indica não observância de fluorescência em vermelho reflete a ausência de células mortas.**

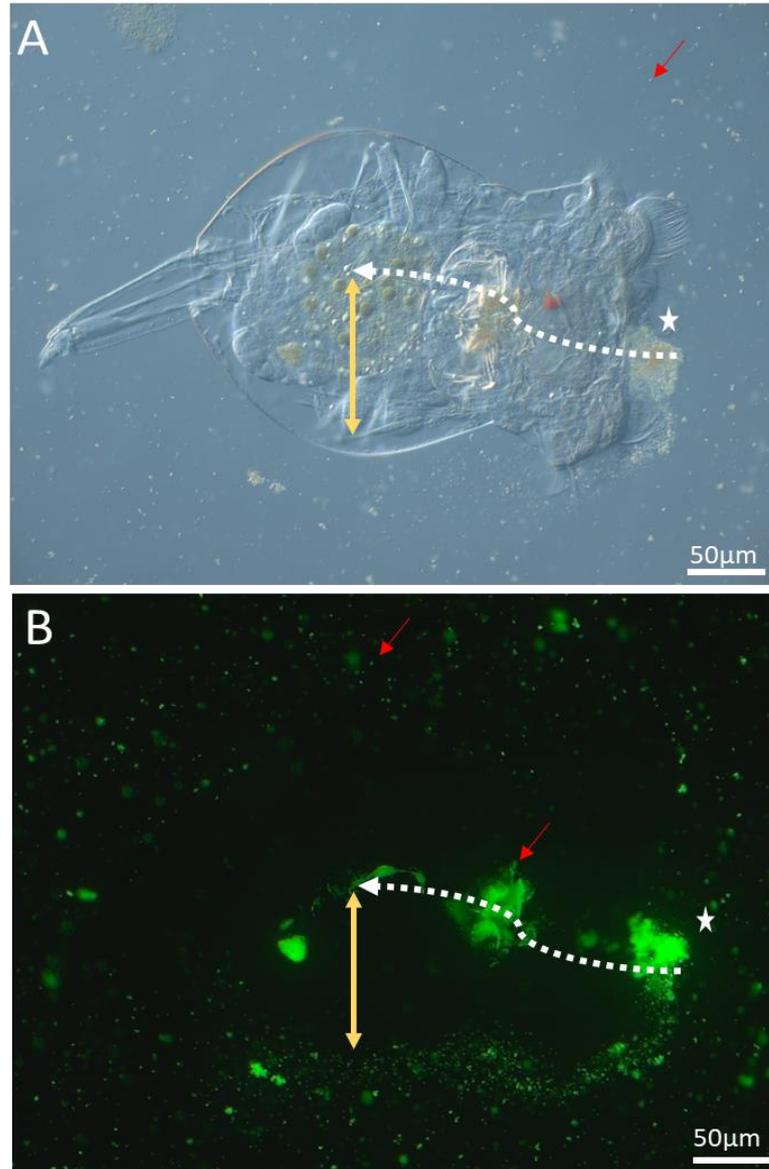
Após observar que a marcação das células do BMC foi eficiente e não ocorreu autofluorescência no rotífero, foi avaliada a interação do consórcio BMC marcado com o rotífero, com a presença dessas bactérias em seu interior, como demonstrado na figura 14. A microscopia de fluorescência foi mostrou a presença de bactérias vivas

na região oral e no trato gastrointestinal do rotífero, que foram absorvidas através dos movimentos ciliares pela sua região oral (estrela) (Figura 14B). Em vermelho, observa-se a marcação de células danificadas ou mortas, em baixa concentração (Figura 14C).



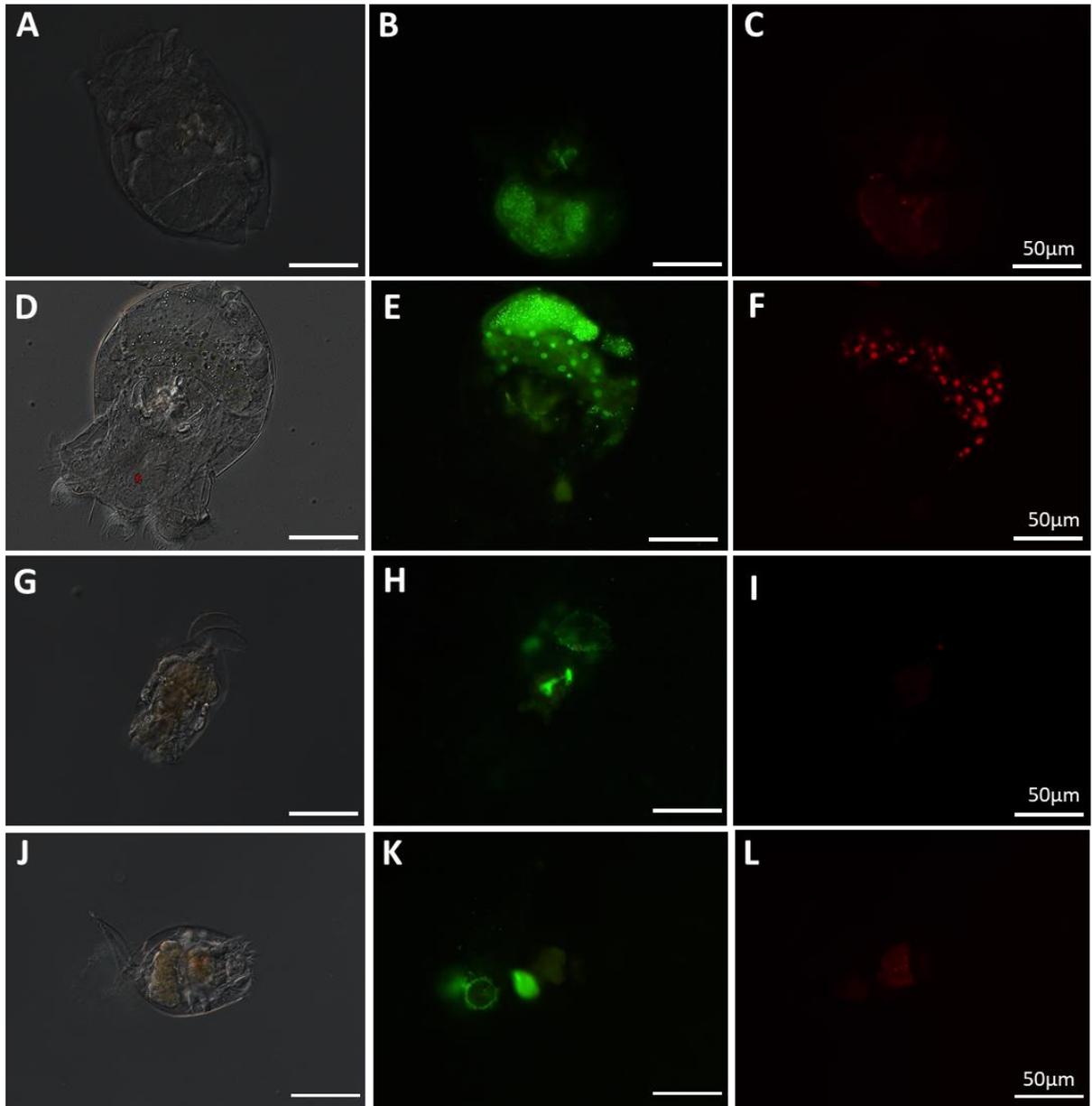
**Figura 14. Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis* com BMC em fluorescência. (A) Adição do BMC marcado no meio com rotíferos para acompanhar a interação. (B) Microscopia de fluorescência (Alexa Fluor 489), com a observação das bactérias vivas no trato gastrointestinal do rotífero. A estrela corresponde a região oral do rotífero. (C) Visualização das células danificadas ou mortas.**

Outras imagens foram feitas para demonstrar o caminho que o BMC percorre no trato gastrointestinal do rotífero, iniciando na região oral (estrela), passando por todo o sistema digestório (seta branca pontilhada) e seguindo para a região caudal; percebe-se também a presença de bactérias ao redor do corpo do rotífero (figura 15).



**Figura 15.** Fotomicrografia do rotífero *B. plicatilis* em fluorescência. Na imagem A, observa-se o rotífero com bactérias presentes no meio (seta vermelha), formando um aglomerado em sua boca (estrela). Na imagem B, observa-se a presença das bactérias no meio (seta vermelha), na região da boca (estrela) e fazendo um caminho no seu sistema digestório (seta branca com pontilhados), e a seta amarela representa a distância entre a extremidade do rotífero até o centro do seu corpo afim de demonstrar o local exato de fluorescência.

Adicionalmente, a figura 16 demonstra que cada bactéria do BMC (*Pseudoalteromonas* sp., *Cobetia* sp., *Halomonas* sp.) apresentou a capacidade de interação com os rotíferos e sobrevivem em seu trato gastrointestinal.

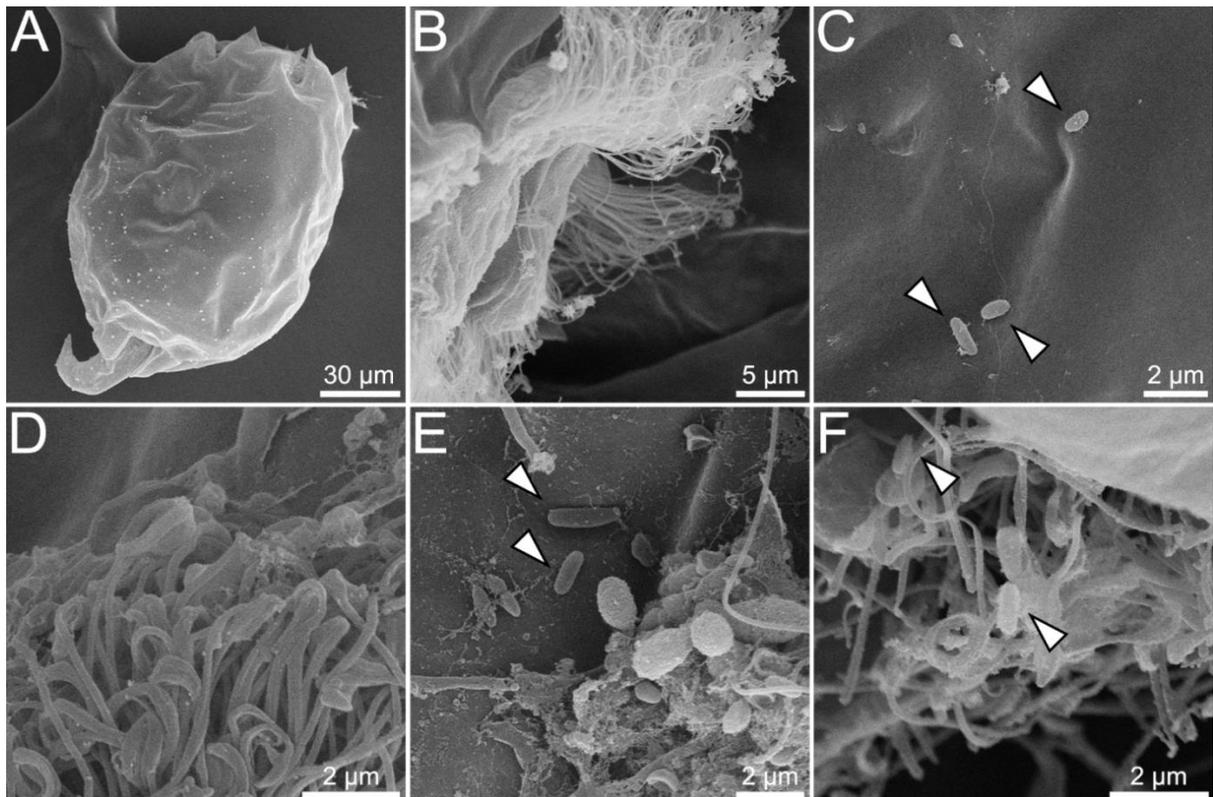


**Figura 16. Microscopia das principais estirpes bacterianas do BMC testado. (A-C) *Pseudoalteromonas* sp. (BMC 1); (D-F) *Pseudoalteromonas* sp. (BMC 2); (G-I) *Pseudoalteromonas* sp. (BMC 3); (J-L) *Halomonas* sp. (BMC 7). (A, D, G e J) Adição do BMC marcado no meio com rotíferos para acompanhar a interação (B, E, H e K) Microscopia de fluorescência com a marcação de células vivas em verde (Alexa Fluor 489). (C, F, I e J) Observação de células danificadas ou mortas em vermelho.**

A partir da observação da interação rotíferos-BMCs na microscopia eletrônica de varredura, observou-se que o tempo de incubação dos rotíferos com as bactérias

do consórcio BMC influenciou na localização em que elas se encontravam no rotífero. Na primeira análise de contagem dos rotíferos, observou-se a presença de 95 rotíferos por ml, na segunda análise 110 rotíferos por ml e na terceira análise, cerca de 100 rotíferos por ml, dando uma média de 100 rotíferos por ml.

Na incubação realizada por 4 horas, as bactérias estavam presentes principalmente na região oral dos rotíferos, enquanto o tratamento com incubação *overnight*, as bactérias foram localizadas no corpo do animal (Figura 17). Nas figuras 17A e 17D, observa-se as bactérias na região oral do rotífero, que corresponde ao tratamento com 4 horas de incubação. Nas figuras 17B e 17E, observa-se aglomerados bacterianos ao longo do corpo do rotífero e as figuras 17C e 17F correspondem as amostras controle, onde não foram observadas bactérias no rotífero, apenas resquícios do tratamento para MEV.



**Figura 17.** Microscopia eletrônica de varredura com os tratamentos rotíferos-BMC, com incubação por 4 horas, *overnight* e controle. (A) e (D) Tratamento de 4 horas, com a presença de bactérias nos cílios da região oral do rotífero (estrela); (B) e (E) Tratamento *overnight*, com a presença de bactérias no corpo do rotífero (seta branca); (C) e (F) Tratamento controle, com a presença de pequenos artefatos decorrentes do processamento da amostra, (círculo preto) sem a presença de bactéria.

### 5.3 Alimentação do coral com o rotífero *Brachionus plicatilis*

As imagens obtidas indicaram que o coral *P. damicornis* captura o rotífero *B. plicatilis* enriquecido com BMCs, através de seus pólipos, como demonstrado na figura 18. É possível observar que um dos pólipos, com 1 mm de tamanho, já apresenta o início da sua reação de alimentação ao capturar um rotífero (Figura 18A). Na figura 18B, observou-se uma maior contração do pólipo e deslocamento dos tentáculos para levar o rotífero para a boca do coral. Em seguida, o pólipo se mantém contraído por alguns minutos e observa-se a presença dos rotíferos nadando ao redor do coral (círculo branco) (Figura 18C). Na figura 18D, observa-se a presença dos rotíferos e dos pólipos do coral abertos aptos para a captura.

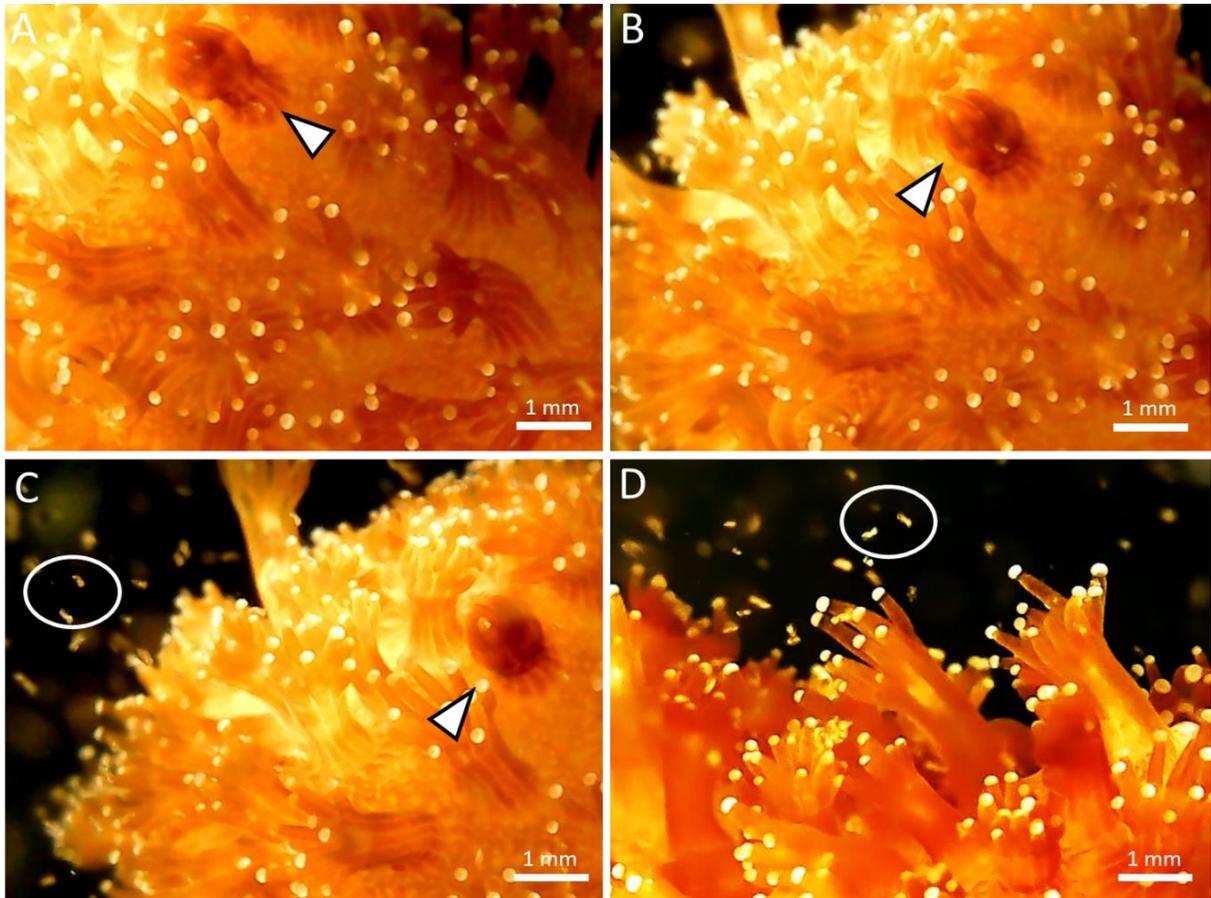
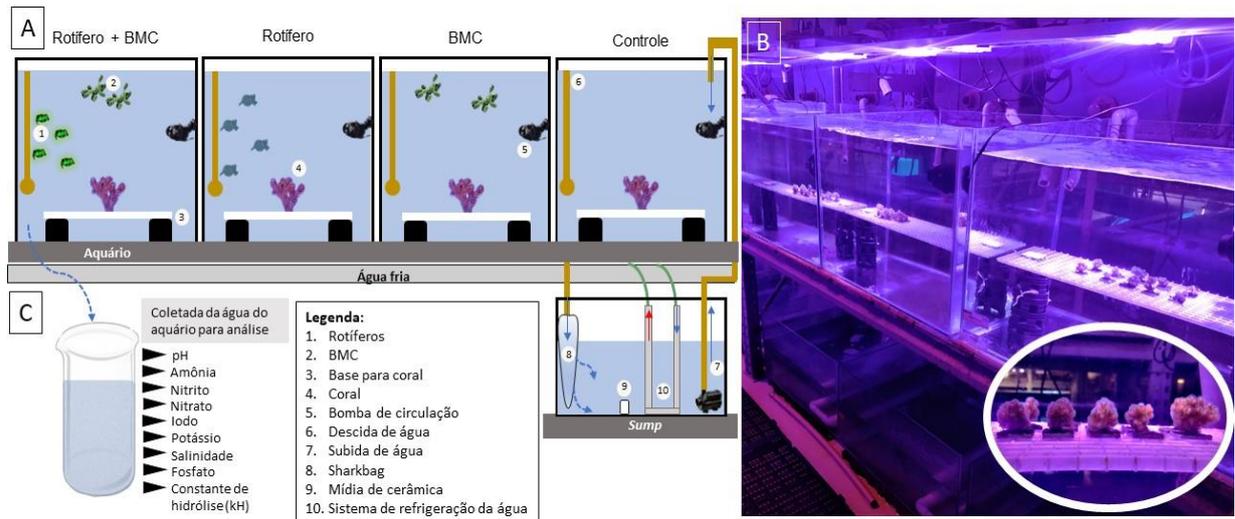


Figura 18. Etapas de captura do rotífero *B. plicatilis* pelo coral *P. damicornis*. (A) Pólipo do coral iniciando a contração após capturar o rotífero (seta branca); (B) Pólipo totalmente contraído, empurrando o rotífero para seu interior; (C) O pólipo contraído (seta branca) e rotíferos nadando ao redor da colônia (círculo branco); (D) Pólipos do coral totalmente abertos para capturar o rotífero.

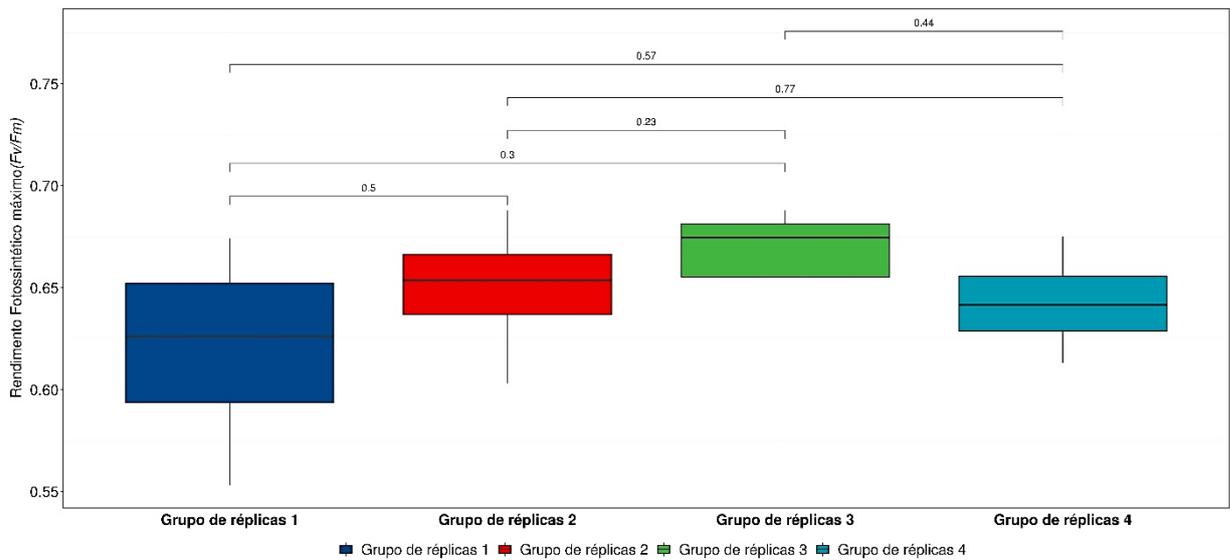
## 5.4 Desenvolvimento do sistema experimental

A estrutura e os parâmetros de controle do sistema experimental foram construídos e devidamente testados. Todos os aquários e *sumps*, iluminação, controle de temperatura e circulação foram devidamente controlados por sensores (Figura 19).



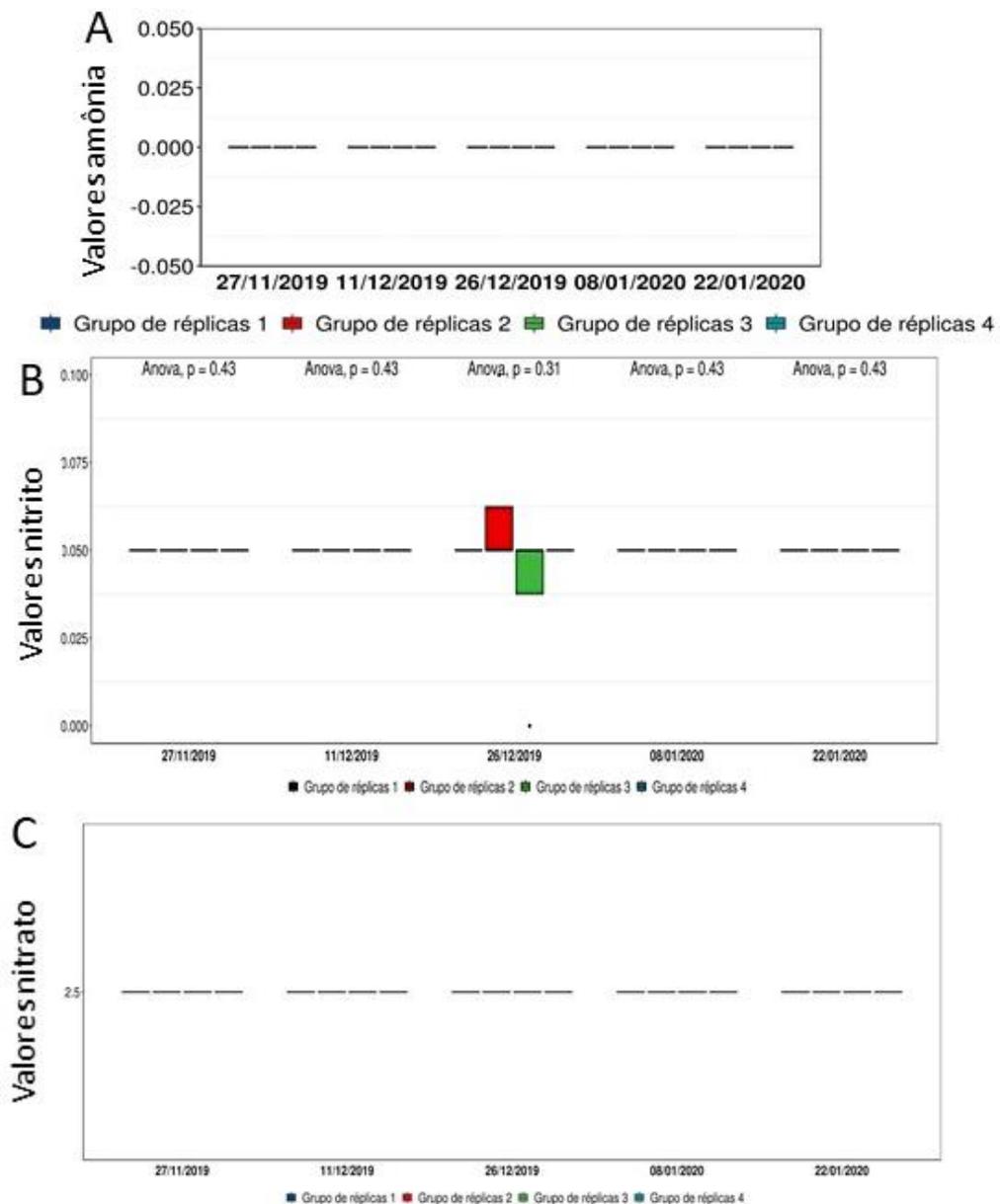
**Figura 19. Sistema experimental para monitoramento do coral *P. damicornis* e dos parâmetros físico-químicos da água. (A) A ilustração na parte superior esquerda representa os quatro tratamentos (rotífero com BMC, rotífero, BMC e controle). (B) À direita, o sistema experimental montado com os corais nas bases e distribuídos de forma randômica. (C) As análises de água feitas no sistema experimental e os equipamentos utilizados nos aquários e nos *sumps*. Cada aquário possui seu próprio sistema de refrigeração e circulação da água.**

A validação biológica do sistema experimental ocorreu após o período de 10 dias de aclimação dos corais. Para a confirmação da saúde dos corais, um fragmento de coral de cada aquário teve seu rendimento quântico  $F_v/F_m$  medido apresentando valores oscilando entre 550 a 690 (figura 20). Os fragmentos foram organizados em 4 réplicas cada e comparados pelo teste-T, que evidenciou não haver diferença significativa entre os grupos de replicatas, com  $p > 0.05$  para todas as combinações de réplicas analisadas.



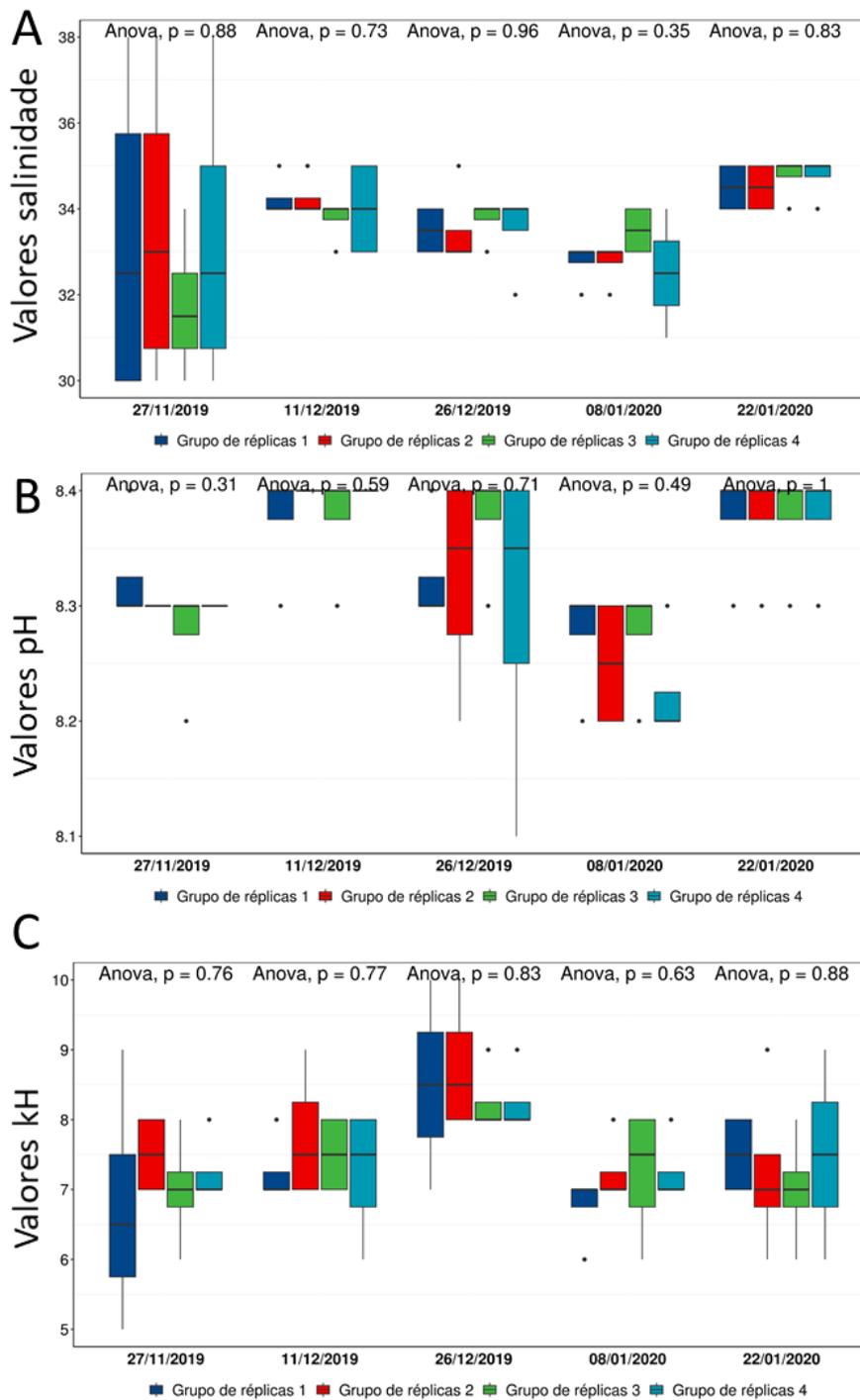
**Figura 20. Análise do rendimento fotossintético máximo ( $F_v/F_m$ ) através do teste-T ( $p > 0.05$ ) ao comparar os quatro grupos de replicatas biológicas.**

A validação físico-química do sistema experimental mostrou que os resultados dos parâmetros de amônia ( $\text{NH}_3$ ) (figura 21A) e nitrato ( $\text{NO}_3$ ) (figura 21C) mantiveram-se estáveis. O valor de nitrito ( $\text{NO}_2$ ) (figura 21B) apresentou uma pequena alteração em duas réplicas no dia 25/12, porém, irrelevante na média da análise desse composto.



**Figura 21. Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de amônia; (B) o gráfico de nitrito; (C) o gráfico de nitrato.**

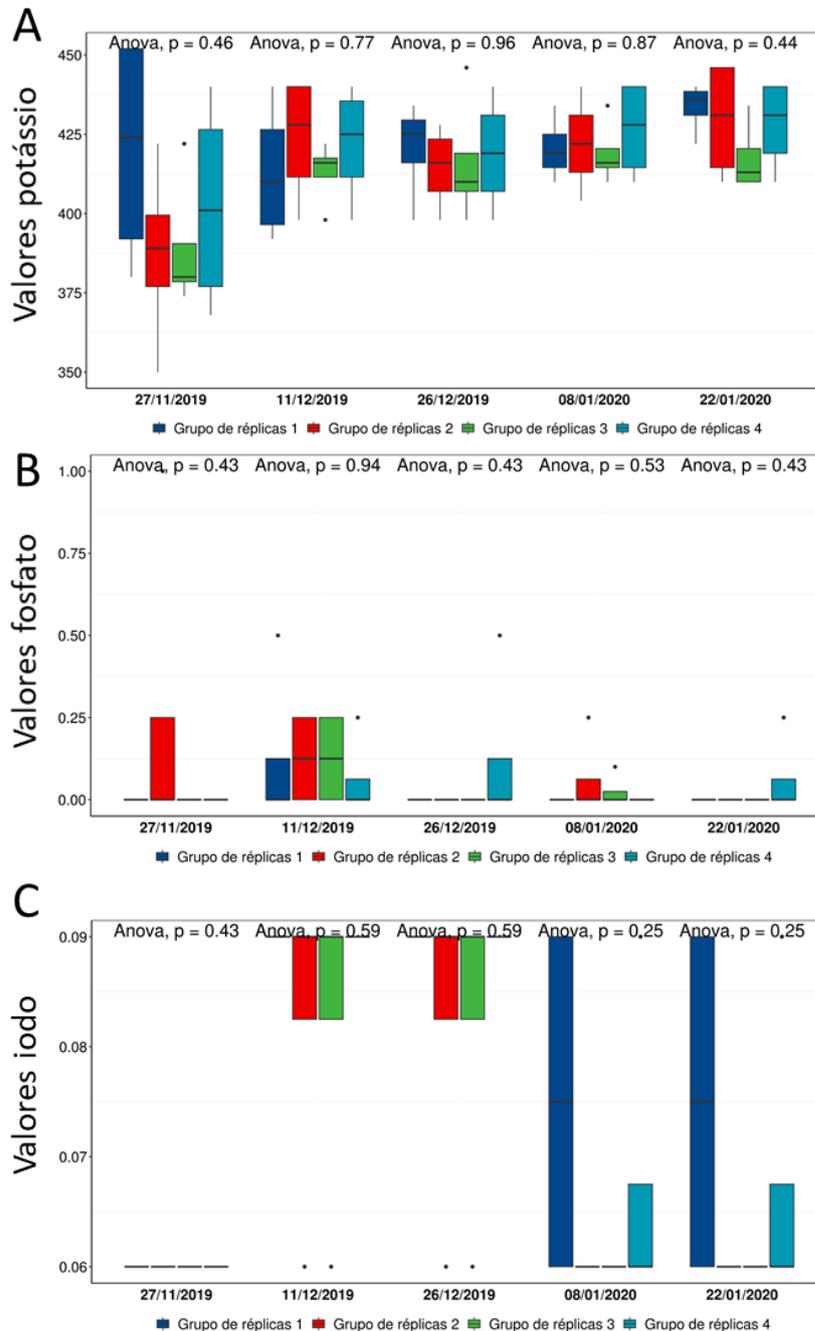
A salinidade (figura 22A) sofreu alteração no início da aclimação do sistema entre as réplicas (29ppm a 35ppm), mas manteve-se estável por pelo menos 30 dias (35ppm entre as réplicas). O pH inicial foi de (figura 22B) 8.3, sendo observada uma pequena alteração durante a aclimação e no final dos 60 dias, onde o pH observado foi de 8.4. A constante de hidrólise (kH) (figura 22C) variou de 7.0 a 10.0 dKH durante os 60 dias de análise, mantendo-se na média de 9.0 dKH, compatível com o ambiente marinho.



**Figura 22.** Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de salinidade; (B) o gráfico de pH; (C) o gráfico de constante de hidrólise (kH).

O potássio (figura 23A) teve apresentou alta variação (380 a 452 mg/L) nos primeiros dias de experimento, com menor variação (420 a 440 mg/L) no final do experimento. O fosfato (figura 23B) também apresentou maiores variações no início do teste do sistema experimental, atingindo 0.25 mg/L, mas, com a estabilização do

sistema, esse parâmetro manteve-se nos patamares alvo abaixo de 0.05 mg/L. O iodo (figura 23C) variou entre 0,06 a 0,09 mg/L, mas teve uma média em 0,06 mg/L, não apresentando alterações significativas ao longo do teste do sistema experimental ( $p > 0.05$ ).



**Figura 23. Análises dos parâmetros físico-químicos da água dos aquários nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias de aclimação. (A) o gráfico de potássio; (B) o gráfico de fosfato; (C) o gráfico de iodo.**

## 6. DISCUSSÃO

Devido aos impactos negativos causados por estresses ambientais e antrópicos (BAIRD; MARSHALL, 2002; HUGHES et al., 2018; DUARTE et al., 2020), é cada vez mais urgente o desenvolvimento de estratégias visando a proteção e a restauração das populações recifais globais. Neste contexto, o desenvolvimento de estratégias sustentáveis para minimizar os impactos dos estresses ambientais nos recifes de coral e fortalecer esses metaorganismos são de extrema valia para a proteção dos recifes.

Uma intervenção apontada como promissora para a recuperação e preservação de recifes é a manipulação do microbioma de coral (PEIXOTO et al., 2017; NASEM, 2019). Os microrganismos benéficos para corais (BMCs) possuem características com potencial para aumentar a resistência e resiliência dos corais frente a diferentes estresses ambientais. Dentre essas características, estão, por exemplo, a mitigação de compostos tóxicos, o controle biológico de patógenos, a participação na ciclagem de nutrientes e produção de metabólitos secundários que auxiliam na proteção e nutrição do hospedeiro (FRAGOSO DOS SANTOS et al., 2015; MORGANS et al., 2019; BLACKALL et al., 2020). A potencial capacidade benéfica de micro-organismos associados aos corais foi investigada no coral *Pocillopora damicornis*, resultando em uma maior proteção e resistência dos corais tratados com o consórcio BMC, frente aos estresses causados pelo aumento de temperatura e infecção pelo patógeno *Vibrio coralliilyticus* (ROSADO et al., 2019).

O presente estudo testou o mesmo consórcio BMC para *Pocillopora damicornis* proposto por Rosado e colaboradores (2019) em meios de cultura específicos para a precipitação de carbonato de cálcio, que pode ser, hipoteticamente, um mecanismo microbiano benéfico relacionado ao aumento na velocidade de calcificação, e crescimento, do coral.

A avaliação de novas características com potencial benéfico para os corais pode significar em um aumento da eficiência do consórcio testado (ROSADO et al., 2019), além da sua aplicação para outros objetivos, como por exemplo em fazendas de corais com finalidade na restauração de populações no ambiente recifal. Por isso, este trabalho avaliou a atividade da enzima urease em meios de cultura específicos. Nossa proposta é que esses mecanismos sejam futuramente testados para avaliação da sua aplicação no incremento da biomineralização de corais escleractíneos. Três

estirpes de *Pseudoalteromonas* sp. (KP016625.1, KU955357.1, KX806641.1) e uma estirpe de *Halomonas* sp. (KJ161492.1) cresceram em meio de urease e poderão ser futuramente testadas quanto ao seu potencial no incremento da biomineralização em corais.

Além da avaliação dessa característica BMC do consórcio obtido por Rosado e colaboradores (2019), o presente estudo desenvolveu uma estratégia inédita de alimentação de corais com o emprego de rotíferos enriquecidos com BMCs. No protocolo desenvolvido, o rotífero atuou como um agente carreador desses micro-organismos para os corais, visando facilitar a entrega desse consórcio em sistemas de cultivo de corais.

Os corais zooxantelados podem obter até 90% das suas necessidades energéticas através da sua relação simbiótica com as algas dinoflageladas fotossintéticas, sendo esta associação de extrema importância para a sobrevivência do coral (PAPINA et al., 2003). Entretanto, parte da energia desses corais pode ser proveniente da alimentação heterotrófica que contém nutrientes essenciais para o crescimento desses metaorganismos (CONLAN et al., 2018). Em *Stylophora pistillata*, a alimentação com zooplâncton resultou no aumento na taxa de calcificação e no crescimento de tecidos (FERRIER-PAGÈS et al., 2003). Dessa forma, desenvolver estratégias de cultivo de coral através da alimentação heterotrófica dos corais enriquecida com probióticos pode representar um duplo benefício para a otimização do crescimento desses organismos em fazendas de cultivo *in situ*. A heterotrofia é uma fonte alimentar adicional, contendo nitrogênio, fósforo e carbono (SOROKIN, 1993).

O outro fator benéfico seria a entrega dos BMCs. Esse sistema de entrega pode aumentar a incorporação dos BMCs pelos corais, aumentando assim sua eficiência probiótica. De fato, os corpos d'água diluem imediatamente qualquer substância que seja introduzida neles. A entrega de substâncias de qualquer tipo (incluindo células inteiras) em sistemas aquáticos é um dos maiores desafios nas aplicações ambientais. Outro ponto importante está relacionado à dinâmica dos corpos d'água, que pode dificultar a aplicação em uma área específica ou indivíduo, o que seria facilitado pela bioencapsulação desses organismos móveis que são ativamente capturados pelos corais

Outra estratégia que pode ser adotada para viabilizar e facilitar a inoculação de BMCs em sistemas aquáticos naturais ou tanques de criação de corais é a imobilização das células a serem entregues. A imobilização é um termo geral que

compreende as várias formas de imobilizar compostos ou células inteiras em um suporte sólido (BOUABIDI et al., 2019).

A principal vantagem da imobilização é que as células confinadas na matriz sólida ficarão protegidas contra impactos físicos (KNOW; DANIELL, 2016). Altas densidades de células também podem ser liberadas lentamente o que, constantemente, diminui a necessidade de inoculação regular das células para manutenção das concentrações desejadas.

Assim como a imobilização em matrizes inertes, o encapsulamento de células vivas, ou bioencapsulação, também constitui em uma estratégia para delimitação de células vivas dentro de uma estrutura para que essas sejam mantidas separadas do ambiente externo por uma membrana semipermeável (BOUABIDI et al., 2019). Os tipos especiais de transportadores usados para encapsular células são os transportadores vivos, como por exemplo através de animais de alimentação viva como *Artemia sp.*, rotíferos e copépodes. Esses carreadores já foram previamente relatados como carreadores eficientes de nutrientes, estimulantes imunológicos e probióticos para organismos aquáticos (HAI et al., 2010; SUN et al., 2013; DECLERCK; PAPAKOSTAS 2017; RUDTANATIP et al., 2019).

Em um dos estudos prévios que avaliaram o uso da bioencapsulação como estratégia para o carreamento e entrega de probióticos para organismos marinhos, probióticos foram entregues ao peixe da espécie *Scophthalmus maximus* através do uso de em culturas alimentares vivas. Os resultados indicaram mudanças na composição da microbiota intestinal das larvas de *Scophthalmus maximus* pela adição de bactérias da espécie *Aeromonas hydrophila* (GATESOUBE, 1991; RINGØ et al., 1996). Ghoname e colaboradores (2020) utilizaram culturas alimentares vivas, como rotíferos e *Artemia salina* enriquecidas com probióticos para alimentar larvas de dourado e constataram uma diferença significativa na sobrevivência dessas larvas.

Apesar do potencial promissor do uso de organismos vivos para o carreamento de compostos e micro-organismos de interesse para organismos marinhos, o carreamento de probióticos para corais por esse tipo de estratégia ainda não havia sido testado anteriormente.

Estudos anteriores mostraram que apesar da presença de associações simbióticas entre rotíferos e bactérias, a obtenção de rotíferos gnotobióticos é um

processo relativamente fácil de ser obtido através da simples alteração de sua dieta (TINH et al., 2006; QI et al., 2009).

Dessa forma, com base em estudos desenvolvidos para outros organismos marinhos e no potencial promissor do uso de rotíferos gnobióticos como carreadores vivos, decidimos testar seu uso no desenvolvimento de um protocolo para o enriquecimento e entrega de rotíferos carreadores de BMC para corais. O primeiro passo para a utilização desses rotíferos enriquecidos com BMCs foi a “limpeza” do trato digestório desses animais. Essa limpeza foi necessária uma vez que, durante a padronização dos protocolos de microscopia, observamos uma autofluorescência dos rotíferos obtidos sob condições normais de cultivo, já que estes animais são alimentados por microalgas (Figura 15ABC). Dessa forma, passamos a utilizar um protocolo em que o rotífero permanece em jejum por 7 dias, para que as algas presentes em seu trato digestório sejam eliminadas (Figura 15DEF). A partir desse momento os rotíferos são então inoculados com BMCs que são rapidamente consumidos pelos animais, reestabelecendo seu trato digestório com os microorganismos desejados (Vídeo 1, Figura 17).

Através das imagens da microscopia (Figura 17), pudemos identificar o caminho percorrido pela bactéria dentro do rotífero. Esse dado confirmou que o rotífero ingeriu as bactérias e as armazenou em seu intestino por pelo menos 3 horas. No entanto, como a coloração viva/morta na microscopia de fluorescência só pode ser realizada antes da inoculação do BMC (para garantir que as células observadas são as células inoculadas, e não bactérias residentes do trato digestório do rotífero), a viabilidade dos BMCs dentro dos rotíferos após a captação não pode ser confirmada.

Entretanto, um grande número de bactérias do consórcio BMC também foi observado aderido à superfície externa dos rotíferos através de microscopia de varredura. Considerando-se que o consórcio BMC contém cinco cepas de *Pseudoalteromonas sp* e que já foi observada a aderência dessas bactérias em superfícies celulares eucarióticas (HOLMSTRÖMEKJELLEBERG, 1999; THOMAS et al., 2008), sugere-se que essas bactérias podem estar entre as estirpes aderidas à superfície do rotífero. *Pseudoalteromonas sp.* produzem compostos antifúngicos que podem impedir o crescimento ou a adesão de outros microrganismos na superfície do rotífero (HOLMSTRÖM; KJELLEBERG, 1999; HOLMSTRÖM et al., 2002). Portanto, rotíferos enriquecidos com BMC usados em experimentos de campo podem ser capazes de impedir a ligação superficial de outras bactérias indesejáveis antes de

serem ingeridos por corais, além de serem capazes de carrear essas bactérias, vivas, aderidas em seu corpo.

É importante ressaltar que, rotíferos podem representar uma vantagem adicional na entrega de BMCs aos corais. Isto ocorre, uma vez que, estudos mostram que, em condições de acidificação (uma condição que vem se agravando com as mudanças globais), corais apresentam um aumento na captura de rotíferos para manter seu aporte de nutrientes. O coral *Acropora cervicornis*, por exemplo, mostrou um aumento de 30% na sua taxa de alimentação por rotífero *B. plicatilis* sob altas concentrações de CO<sub>2</sub> (TOWLE et al., 2015). Isso correspondeu a um aumento no teor lipídico total no coral, que pode favorecer a saúde dos corais (TOWLE et al., 2015).

Com as imagens do microscópio com super zoom (Figura 21), pode-se ainda observar a predação dos rotíferos pelo coral através dos tentáculos e muco, trazendo a comida para a boca, evidenciando a reação de alimentação do pólipó, evidenciando a viabilidade deste método de carreamento de probióticos. As bactérias escolhidas para o consórcio BMC apresentam alta atividade de catalase, o que pode reduzir os danos causados por espécies reativas de oxigênio que são produzidas em resposta ao estresse dentro do animal coral (PEIXOTO et al., 2017; ROSADO et al., 2019). Uma das bactérias da BMC, *Pseudoalteromonas sp.* cepa KU955357.1, também tem o potencial de proteger o coral através de comportamento antagônico contra o patogênico *Vibrio coralliilyticus* (ROSADO et al., 2019). Portanto, *Pseudoalteromonas sp.* cepa KU955357.1 tem papéis importantes que podem ser aplicados no muco do coral, bem como em seus tecidos. Além disso, seis das cepas (cinco *Pseudoalteromonas sp.* e uma *Halomonas taeanensis*) contêm enzimas envolvidas na fixação de nitrogênio ou no ciclo do enxofre, processos que foram observados em bactérias dentro do muco do coral e dentro dos seus tecidos (RAINA et al., 2009; RÄDECKER et al., 2015). Assim, com a ingestão do BMC através dos rotíferos enriquecidos, os corais podem utilizar as funções das bactérias ingeridas para promover a sua saúde.

Este estudo fornece dessa forma uma alternativa para o carreamento e entrega de BMCs para corais. Os rotíferos ingeriram livremente o consórcio BMC, que foram detectados por pelo menos 16 horas aderidos ao corpo dos rotíferos, de acordo com as imagens de microscopia de varredura. Os rotíferos também foram ingeridos por

pólipos de coral em experimento de mesocosmos, comprovando a eficácia do uso de rotíferos como sistemas de entrega de BMC.

Com o intuito de realizar testes futuros de aplicação de rotíferos enriquecidos com BMCs, a estabilidade de um sistema experimental para o cultivo de corais com réplicas verdadeiras em tanques de 200 litros foi desenvolvida e testada, com variação circadiana da intensidade luminosa e controle de temperatura.

Sistemas experimentais são fundamentais para o estudo de respostas ao estresse ecológico, biológico e fisiológico dos organismos marinhos, e uma variedade de parâmetros da água de acordo com as mudanças de temperatura e acidificação (DUARTE et al., 2015), dos efeitos de derramamento de petróleo (SILVA et al., 2019) ou para estudos de manipulação da microbiota dos corais em microcosmos (ROSADO et al., 2019). Os corais são organismos que requerem sistemas que mantenham os parâmetros físico-químicos estáveis (WATSON; HILL, 2006) já que diferentes espécies podem sofrer ou não variadas respostas em seu microbioma ao ser mantido *ex situ* (GALAND et al., 2018) como também a alimentação pode alterar seu microbioma ao comparar com espécies *in situ* e *ex situ* (GALAND et al., 2020).

Para isso, parâmetros físico-químicos e critérios no projeto de montagem do sistema merecem atenção. Desta forma, foi desenvolvido um sistema de tanques de 140 litros com *sump* integrado de 60L para a avaliação da entrega de rotíferos em sistema de tanques maiores dos que foram previamente utilizados por nosso grupo. Além disso, um sistema de iluminação com LEDs que mimetiza as variações circadianas da irradiância em recifes de corais, bem como seu espectro foi implementado para ampliar ainda mais o realismo do sistema. Os resultados do rendimento quântico máximo da fotossíntese ( $F_v/F_m$ ) evidenciaram uma homogeneidade deste rendimento nas zooxantelas, micro-organismo simbiote fundamental para a nutrição do coral, que contribui com cerca de 90% do carbono e nitrogênio para o hospedeiro (TREMBLAY et al., 2012). Dessa forma, foi evidenciado que o sistema possui estabilidade ao manter os corais em boa condição fotossintética, mostrando que seu sistema de iluminação que simula o ciclo circadiano da luz do Sol foi satisfatório. Vale ressaltar que o trata-se de réplicas totalmente independentes, o que permitiria a variação intra-réplicas, porém, os resultados mostraram que a não variação significativa do rendimento quântico da fotossíntese das amostras de *P. damicornis* demonstrou capacidade do sistema experimental para testar o efeito BMC carregado por *B. plicatilis*.

Os resultados indicaram uma suficiente estabilidade desse sistema experimental, com aquários réplicas independentes, garantindo uma replicagem verdadeira, com uma maior troca entre aquário e *sump* (3000L/h). Esse sistema pode, dessa forma, ser facilmente adaptado para testar outras condições ambientais, outros contaminantes ou diferentes organismos marinhos sem causar contaminação entre as réplicas e utilizando sua maior capacidade de água.

## 7. CONCLUSÃO

- O consórcio BMC proposto por Rosado e colaboradores (2019) mostrou seu possível potencial de contribuir na biomineralização e crescimento de corais por apresentar estirpes capazes de precipitar carbonato de cálcio;
- Os micro-organismos bioencapsulados por *Brachionus plicatilis* mantiveram-se no corpo do rotífero por 16 horas
- O coral *Pocillopora damicornis* capturou o rotífero *Brachionus plicatilis* enriquecido com bactérias benéficas aos corais (BMC) sugerindo que essa abordagem parece promissora para o carreamento e entrega de BMCs para *Pocillopora damicornis*;
- O sistema experimental projetado foi validado para manter os corais da espécie *Pocillopora damicornis* em ambiente controlado, com réplicas verdadeiras e independentes, mantendo o  $F_v/F_m$  e os atributos físico-químicos da água estáveis.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABELSON, A. Artificial reefs vs coral transplantation as restoration tools for mitigating coral reef deterioration: Benefits, concerns, and proposed guidelines. **Bulletin of Marine Science**, [S. l.], v. 78, n. 1, p. 151–159, 2006.
- AHMED, H. I. *et al.* Long-term temperature stress in the Coral Model Aiptasia supports the “anna Karenina principle” for bacterial microbiomes. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 10, n. MAY, p. 1–11, 2019.
- ADEY, W. H. The microcosm: A new tool for reef research. **Coral Reefs**, 1(3), 193–201, 1983.
- AINSWORTH, T. D. *et al.* The coral core microbiome identifies rare bacterial taxa as ubiquitous endosymbionts. **ISME Journal**, [S. l.], v. 9, n. 10, p. 2261–2274, 2015.
- AINSWORTH, T. D.; GATES, R. D. Corals’ microbial sentinels. **Science**, [S. l.], v. 352, n. 6293, p. 1518–1519, 2016.
- AINSWORTH, T. D.; THURBER, R. V.; GATES, R. D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends in Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 233–240, 2010.
- ALAGELY, A. *et al.* Signaling-mediated cross-talk modulates swarming and biofilm formation in a coral pathogen *Serratia marcescens*. **ISME Journal**, [S. l.], v. 5, n. 10, p. 1609–1620, 2011.
- ALBRIGHT, R. *et al.* Reversal of ocean acidification enhances net coral reef calcification. **Nature**, [S. l.], v. 531, n. 7594, p. 362–365, 2016.
- ALLEMAND, D., & FURLA, P.. How does an animal behave like a plant? Physiological and molecular adaptations of zooxanthellae and their hosts to symbiosis. **Comptes rendus biologiques**, 341(5), 276-280, 2018.
- AMSELLEM, J.; CLÉMENT, P. A Simplified Method for the Preparation of Rotifers for Transmission and Scanning Electron Microscopy. *In*: **Rotatoria**. Dordrecht: Springer Netherlands. p. 119–122, 1980.
- ANTHONY, K. R. .; FABRICIUS, K. E. Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 252, n. 2, p. 221–253, 2000.
- ANTHONY, K. R. N. *et al.* Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 105, n. 45, p. 17442–17446, 2008.
- BABCOCK, R.; DAVIES, P. Effects of sedimentation on settlement of *Acropora millepora*. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 9, n. 4, p. 205–208, 1991.
- BACHOK, Z.; MFILINGE, P.; TSUCHIYA, M. Characterization of fatty acid composition in healthy and bleached corals from Okinawa, Japan. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 25, n. 4, p. 545–554, 2006.
- BAHR, K. D. *et al.* Abundance, size, and survival of recruits of the reef coral *Pocillopora acuta* under ocean warming and acidification. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 15, n. 2, p. 1–13, 2020.
- BAIRD, A. H. *et al.* Coral bleaching: the role of the host. **Trends in Ecology &**

**Evolution**, [S. l.], v. 24, n. 1, p. 16–20, 2009.

BAKER, D. M. *et al.* Climate change promotes parasitism in a coral symbiosis. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 12, n. 3, p. 921–930, 2018.

BALABANOVA, L. A., *et al.* The Genome of the marine bacterium *Cobetia marina* KMM 296 isolated from the mussel *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853). **Russian Journal of Marine Biology**, 42(1), 106–109, 2016.

BALL, R. *et al.* **Reef Rehabilitation**. [S. l.: s. n.]. v. 501E-book.

BANIN, E., VASSILAKOS, D., ORR, E., MARTINEZ, R. J., ROSENBERG, E. Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. **Current microbiology**, 46(6), 0418-0422, 2003.

BAROTT, K. L.; ROHWER, F. L. Unseen players shape benthic competition on coral reefs. **Trends in Microbiology**, [S. l.], v. 20, n. 12, p. 621–628, 2012.

BEDNARZ, V. N. *et al.* Seasonal variation in dinitrogen fixation and oxygen fluxes associated with two dominant zooxanthellate soft corals from the northern Red Sea. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 519, p. 141–152, 2015.

BEECHIE, T.J.; STEEL, E.A.; RONI, P.; QUIMBY, E. Ecosystem recovery planning for listed salmon: an integrated assessment approach salmon habitat. U.S. Dept. Commer., **NOAA Tech. Memo. NMFS-NWFSC-58**, p. 183, 2003.

BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; ROSENBERG, E. Temperature-Regulated Bleaching and Lysis of the Coral. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 69, n. 7, p. 4236–4242, 2003.

BHADURI, S. *et al.* Microbiologically induced calcite precipitation mediated by *sporosarcina pasteurii*. **Journal of Visualized Experiments**, [S. l.], v. 2016, n. 110, p. 1–7, 2016.

BLACKALL LINDA, L. *et al.* Probiotics for corals. **Microbiology Australia** 41, 100-104, 2020.

BOSCH, T. C., & MCFALL-NGAI, M. J. Metaorganisms as the new frontier. **Zoology**, 114(4), 185-190, 2011.

BOSCH T.C.G., MILLER D.J. Bleaching as an Obvious Dysbiosis in Corals. In: The Holobiont Imperative. **Springer**, Vienna, 2016.

BOSQUE, T. *et al.* Effects of salinity, temperature and food level on the demographic characteristics of the seawater rotifer *synchaeta littoralis rousselet*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 258, n. 1, p. 55–64, 2001.

BOURNE, D. *et al.* Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **ISME Journal**, [S. l.], v. 2, n. 4, p. 350–363, 2008.

BOURNE, D. G.; MORROW, K. M.; WEBSTER, N. S. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. **Annual Review of Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 1, p. 317–340, 2016.

BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 7, n. 8, p. 1162–1174, 2005.

- BRUNO, J. F., CÔTÉ, I. M., & TOTH, L. T. (2019). 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*, 11, 307-334.
- BURKE, L. *et al.* **Reefs at risk revisited**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.
- BURRIESCI, M. S.; RAAB, T. K.; PRINGLE, J. R. Evidence that glucose is the major transferred metabolite in dinoflagellate-cnidarian symbiosis. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 215, n. 19, p. 3467–3477, 2012.
- CAPOTONDI, A. *et al.* Enhanced upper ocean stratification with climate change in the CMIP3 models. **Journal of Geophysical Research: Oceans**, [S. l.], v. 117, n. 4, p. 1–23, 2012.
- CARDINI, U. *et al.* Functional significance of dinitrogen fixation in sustaining coral productivity under oligotrophic conditions. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 282, n. 1818, 2015.
- CEH, J. *et al.* Coral-Bacterial Communities before and after a Coral Mass Spawning Event on Ningaloo Reef. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 7, n. 5, p. e36920, 2012.
- CERTNER, R. H.; VOLLMER, S. V. Evidence for Autoinduction and Quorum Sensing in White Band Disease-Causing Microbes on *Acropora cervicornis*. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, n. 1, p. 11134, 2015.
- CHAHAL, N.; RAJOR, A.; SIDDIQUE, R. Calcium carbonate precipitation by different bacterial strains. **African Journal of Biotechnology**, [S. l.], v. 10, n. 42, p. 8359–8372, 2011.
- CHALKER, B. E.; BARNES, D. J. Gamma densitometry for the measurement of skeletal density. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 11–23, 1990.
- CHEN, C. Y. *et al.* Habitat and indigenous gut microbes contribute to the plasticity of gut microbiome in oriental river prawn during rapid environmental change. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 7, p. 1–20, 2017.
- CHIAZZARI, B.; MAGALON, H.; GÉLIN, P.; MACDONALD, A. Living on the edge: Assessing the diversity of South African *Pocillopora* on the margins of the Southwestern Indian Ocean. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1–19, 2019.
- COHEN, A.L.; HOLCOMB, M. 2009. Why corals care about ocean acidification: Uncovering the mechanism. *Oceanography*, 22(4):118-127.
- CONCEIÇÃO, L. E. C.; ARAGÃO, C.; RØNNESTAD, I. Protein Metabolism and Amino Acid Requirements in Fish Larvae. **Avances en Nutrición Acuicola X**, [S. l.], v. 10, p. 250–263, 2010.
- CONLAN, J. A. *et al.* Influence of different feeding regimes on the survival, growth, and biochemical composition of *Acropora* coral recruits. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1–20, 2017.
- CONLAN, J. A. *et al.* Comparing the capacity of five different dietary treatments to optimise growth and nutritional composition in two scleractinian corals. **PLOS ONE**, [S. l.], v. 13, n. 11, p. e0207956, 2018.
- CROSSLAND, C. J. In situ release of mucus and DOC-lipid from the corals *Acropora variabilis* and *Stylophora pistillata* in different light regimes. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 35–42, 1987.

- CZIESIELSKI, M. J.; SCHMIDT-ROACH, S.; ARANDA, M. The past, present, and future of coral heat stress studies. **Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 9, n. 17, p. 10055–10066, 2019.
- DALSGAARD, J. *et al.* Fatty acid trophic markers in the pelagic marine environment. In: [S. l.: s. n.], p. 225–340. *E-book*.
- DAVY, S. K.; ALLEMAND, D.; WEIS, V. M. Cell Biology of Cnidarian-Dinoflagellate Symbiosis. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, [S. l.], v. 76, n. 2, p. 229–261, 2012.
- De Castro, A. P., Araújo, S. D., Reis, A. M. M., Moura, R. L., Francini-Filho, R. B., Pappas, G., ... Krüger, R. H. Bacterial Community Associated with Healthy and Diseased Reef Coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. **Microbial Ecology**, 59(4), 658–667, 2010.
- DE'ATH, G.; LOUGH, J. M.; FABRICIUS, K. E. Declining Coral Calcification on the Great Barrier Reef. **Science**, [S. l.], v. 323, n. 5910, p. 116–119, 2009.
- DEINES, P.; HAMMERSCHMIDT, K.; BOSCH, T. C. The effect of symbiosis on symbiont fitness – interactions within a simple metaorganism. **bioRxiv**, [S. l.], p. 609271, 2019.
- DHAMI, N. K.; REDDY, M. S.; MUKHERJEE, A. Biomineralization of calcium carbonate polymorphs by the bacterial strains isolated from calcareous sites. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 23, n. 5, p. 707–714, 2013.
- DIEDRICH, A. The impacts of tourism on coral reef conservation awareness and support in coastal communities in Belize. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 26, n. 4, p. 985–996, 2007.
- DODDS, L. *et al.* Lipid biomarkers reveal geographical differences in food supply to the cold-water coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia). **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 397, p. 113–124, 2009.
- DOMART-COULON, I. J. *et al.* A basidiomycete isolated from the skeleton of *Pocillopora damicornis* (Scleractinia) selectively stimulates short-term survival of coral skeletogenic cells. **Marine Biology**, [S. l.], v. 144, n. 3, p. 583–592, 2004.
- DUARTE, G. A., VILLELA, H. D., DEOCLECIANO, M., SILVA, D., BARNO, A., CARDOSO, P. M., ... & SANTORO, E. P. Heat waves are a major threat to turbid coral reefs in Brazil. **Frontiers in Marine Science**, 7, 179, 2020.
- DUBINSKY, Z.; JOKIEL, P. L. Ratio of Energy and Nutrient Fluxes Regulates Symbiosis between Zooxanthellae and Corals. **Pacific Science**, [S. l.], v. 48, n. 3, p. 313–324, 1994.
- DUNLAP, W. C.; SHICK, J. M. REVIEW-ULTRAVIOLET RADIATION-ABSORBING MYCOSPORINE-LIKE AMINO ACIDS IN CORAL REEF ORGANISMS: A BIOCHEMICAL AND ENVIRONMENTAL PERSPECTIVE. **Journal of Phycology**, [S. l.], v. 34, n. 3, p. 418–430, 1998.
- EAKIN, CM. Where have all the carbonates gone? A model comparison of calcium carbonate budgets before and after the 1982–1983 El Niño at Uva Island in the eastern Pacific. **Coral Reefs** 15:109–119, 1996.
- EDWARDS, A.J; CLARK, S. Coral transplantation: a useful management tool or misguided meddling? **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 37, n. 8–12, p. 474–487,

1999.

EDWARDS, A.; JOB, S.; WELLS, S. Learning lessons from past reef-rehabilitation projects. *In*: EDWARDS, A. J. *et al.* (org.). **Reef Rehabilitation**. Coral Reef ed. St Lucia, Australia. P.166, 2010.

EGAN, S.; GARDINER, M. Microbial dysbiosis: rethinking disease in marine ecosystems. **Frontiers in microbiology**, 7, 991, 2016.

EPSTEIN, N.; BAK, R. P. M.; RINKEVICH, B. Applying forest restoration principles to coral reef rehabilitation. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 387–395, 2003.

ESSER, D. *et al.* Functions of the Microbiota for the Physiology of Animal Metaorganisms. **Journal of Innate Immunity**, [S. l.], v. 11, n. 5, p. 393–404, 2019.

FALINI, G.; FERMANI, S.; GOFFREDO, S. Coral biomineralization: A focus on intra-skeletal organic matrix and calcification. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [S. l.], v. 46, p. 17–26, 2015.

FALKOWSKI, P. G. *et al.* Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. **BioScience**, [S. l.], v. 34, n. 11, p. 705–709, 1984a.

FALKOWSKI, P. G. *et al.* Light and the Bioenergetics of a Symbiotic Coral. **BioScience**, [S. l.], v. 34, n. 11, p. 705–709, 1984b.

FALKOWSKI, P. G. *et al.* Population Control in Symbiotic Corals. **BioScience**, [S. l.], v. 43, n. 9, p. 606–611, 1993.

MARANGONI, FERNANDES DE BARROS *et al.* Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação, 2016.

FERRIER-PAGES, C. *et al.* Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 229–240, 2003.

FERRIER-PAGÈS, C. *et al.* Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 22, n. 3, p. 229–240, 2003.

FERRIER-PAGÈS, C. *et al.* Microheterotrophy in the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*: Effects of light and ciliate density. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 43, n. 7, p. 1639–1648, 1998.

FERRIER, M. D. Net uptake of dissolved free amino acids by four scleractinian corals. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 183–187, 1991.

FERSE, S. C. A. Poor performance of corals transplanted onto substrates of short durability. **Restoration Ecology**, [S. l.], v. 18, n. 4, p. 399–407, 2010.

FIGUEIREDO, J. *et al.* Ontogenetic change in the lipid and fatty acid composition of scleractinian coral larvae. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 613–619, 2012.

FISHER, R., O'LEARY, R. A., LOW-CHOY, S., MENGERSEN, K., KNOWLTON, N., BRAINARD, R. E., & CALEY, M. J. Species Richness on Coral Reefs and the Pursuit of Convergent Global Estimates. *Current Biology*, 25(4), 500–505, 2015.

FISK, D.; JOB, S. Funafuti Atoll (Republic of Tuvalu) Coral reef restoration project, 1 to 18 months post-trial Monitoring report. [S. l.], n. March, p. 44, 2009.

- FONTANETO, D.; DE SMET, W. H.; RICCI, C. Rotifers in saltwater environments, re-evaluation of an inconspicuous taxon. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [S. l.], v. 86, n. 4, p. 623–656, 2006.
- FRAGOSO DOS SANTOS, H., *et al.* Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. **Scientific Reports**, 5(1), 2015.
- FRANCINI-FILHO, R. B. *et al.* Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 56, n. 5, p. 1008–1014, 2008.
- FRIELER, K. *et al.* Limiting global warming to 2 °C is unlikely to save most coral reefs. **Nature Climate Change**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 165–170, 2013.
- FU, Y., K. HIRAYAMA & Y. NATSUKARI, 1991a. Morphological differences between two types of the rotifer *Brachionus plicatilis* O.F. Muller. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 151: 29–41.
- GALAND PE, CHAPRON L, MEISTERTZHEIM A-L, PERU E AND LARTAUD F. The Effect of Captivity on the Dynamics of Active Bacterial Communities Differs Between Two Deep-Sea Coral Species. **Front. Microbiol.** 1. 2018
- GALAND PE, REMIZE M, MEISTERTZHEIM AL, PRUSKI AM, PERU E, SUHRHOFF TJ, LE BRIS N, VÉTION G AND LARTAUD F. Diet Shapes Cold-Water Corals Bacterial Communities. 22 **Environ. Microbiol.** 354, 2020.
- GARREN, M.; AZAM, F. Corals shed bacteria as a potential mechanism of resilience to organic matter enrichment. **ISME Journal**, [S. l.], v. 6, n. 6, p. 1159–1165, 2012.
- GARRISON, V.; WARD, G. Storm-generated coral fragments – A viable source of transplants for reef rehabilitation. **Biological Conservation**, [S. l.], v. 141, n. 12, p. 3089–3100, 2008.
- GATESOUBE, F.-J. Experimental infection of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae with a strain of *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Fish Diseases**, [S. l.], v. 14, n. 4, p. 495–498, 1991.
- GLYNN PW, WELLINGTON GM, BIRKELAND C. Coral reef growth in the Galápagos: limitation by sea urchins. **Science**, 203:47–49, 1979.
- GLYNN PW (1997) Bioerosion and coral reef growth: a dynamic balance. In: **Birkeland C (ed) Life and death on coral reefs**. Chapman Hall, New York, pp 68–95
- GLYNN, P. W.; , CORTES, J., GUZMAN, H. M., AND RICHMOND, R. H. El nino (1982-1983) associated coral mortality and relationship to sea surface temperature deviations in the tropical eastern Pacific. **6th International Coral Reef Symposium**, 1988.
- GLYNN, P. W. *et al.* Reef coral reproduction in the eastern Pacific: Costa Rica, Panama, and Galapagos Islands (Ecuador) - I. Pocilloporidae. **Marine Biology**, [S. l.], v. 109, n. 3, p. 355–368, 1991.
- GOCHFELD, D. J.; AEBY, G. S. Antibacterial chemical defenses in Hawaiian corals provide possible protection from disease. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 362, p. 119–128, 2008.
- GOLDBERG, W. M. Gastrodermal structure and feeding responses in the scleractinian *Mycetophyllia reesi*, a coral with novel digestive filaments. **Tissue and**

**Cell**, [S. l.], v. 34, n. 4, p. 246–261, 2002.

GOREAU, T.; HILBERTZ, W. Marine ecosystem restoration: costs and benefits for coral reefs. **World resource review**, [S. l.], v. 17, n. 3, p. 375–409, 2005.

GROTTOLI, A. G. Effect of light and brine shrimp on skeletal  $\delta^{13}\text{C}$  in the Hawaiian coral *P. orites compressa*: a tank experiment. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [S. l.], v. 66, n. 11, p. 1955–1967, 2002.

GROTTOLI, A. G.; RODRIGUES, L. J.; PALARDY, J. E. Heterotrophic plasticity and resilience in bleached corals. **Nature**, [S. l.], v. 440, n. 7088, p. 1186–1189, 2006.

GROTTOLI, A. G.; WELLINGTON, G. M. Effect of light and zooplankton on skeletal  $\delta^{13}\text{C}$  values in the eastern Pacific corals *Pavona clavus* and *Pavona gigantea*. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 18, n. 1, p. 29–41, 1999.

GUZMAN, HM; CORTE´S, J. Growth rates of eight species of scleractinian corals in the eastern Pacific (Costa Rica). **Bull Mar Sci** 44:1186–1194, 1989.

HADJIOANNOU, L. *et al.* Response of the temperate scleractinian coral *Cladocora caespitosa* to high temperature and long-term nutrient enrichment. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

HAMMES, F. *et al.* Strain-specific ureolytic microbial calcium carbonate precipitation. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 4901–4909, 2003.

HAMMES, F.; VERSTRAETE\*, W. Key roles of pH and calcium metabolism in microbial carbonate precipitation. **Reviews in Environmental Science and Bio/Technology**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 3–7, 2002.

Hamre, K. Nutrient profiles of rotifers (*Brachionus* sp.) and rotifer diets from four different marine fish hatcheries. **Aquaculture**, 450, 136–142, 2016.

HEFFNER, R. A.; BUTLER, M. J.; REILLY, C. K. Pseudoreplication revisited. **Ecology**, [S. l.], v. 77, n. 8, p. 2558–2562, 1996.

HEIN, M. Y. *et al.* The need for broader ecological and socioeconomic tools to evaluate the effectiveness of coral restoration programs. **Restoration Ecology**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 873–883, 2017.

HEINTZ, C.; MAIR, W. You are what you host: Microbiome modulation of the aging process. **Cell**, [S. l.], v. 156, n. 3, p. 408–411, 2014.

HENKE, J. M.; BASSLER, B. L. Three Parallel Quorum-Sensing Systems Regulate Gene Expression in *Vibrio harveyi*. **Journal of Bacteriology**, [S. l.], v. 186, n. 20, p. 6902–6914, 2004.

HERON, S. F. *et al.* Warming Trends and Bleaching Stress of the World's Coral Reefs 1985-2012. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 6, n. December, p. 1–14, 2016.

HEYWARD, A. J.; NEGRI, A. P. Plasticity of larval pre-competency in response to temperature: Observations on multiple broadcast spawning coral species. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 631–636, 2010.

HILL, L. J. *et al.* Acidification-induced cellular changes in symbiodinium isolated from *mussismilia braziliensis*. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 1–21, 2019.

HILL, R.; RALPH, P. J. Diel and seasonal changes in fluorescence rise kinetics of three scleractinian corals. **Functional Plant Biology**, [S. l.], v. 32, n. 6, p. 549, 2005.

- HODGSON, G. **Corals**. FAO, Rome: [s. n.], 1998.
- HOEGH-GULDBERG, O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine and Freshwater Research**, [S. l.], v. 50, n. 8, p. 839–866, 1999.
- HOEGH-GULDBERG, O. *et al.* Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. **Science (New York, N.Y.)**, [S. l.], v. 318, n. 5857, p. 1737–1742, 2007.
- HOEGH-GULDBERG, O. *et al.* Coral reef ecosystems under climate change and ocean acidification. **Frontiers in Marine Science**, [S. l.], v. 4, n. MAY, 2017.
- HOEGH-GULDBERG, O. Coral reefs in a changing world. *The Great Barrier Reef: Biology, Environment and Management*, 143, 2019.
- HOEKSEMA, B. W.; ROGERS, A.; QUIBILAN, M. C. ***Pocillopora damicornis*, The IUCN Red List of Threatened Species**, 2014.
- HOULBRÈQUE, F. *et al.* Importance of a micro-diet for scleractinian corals. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 282, p. 151–160, 2004.
- HOULBRÈQUE, F.; FERRIER-PAGÈS, C. Heterotrophy in tropical scleractinian corals. **Biological Reviews**, [S. l.], v. 84, n. 1, p. 1–17, 2009.
- HOULBRÈQUE, F.; TAMBUTTÉ, E.; FERRIER-PAGÈS, C. Effect of zooplankton availability on the rates of photosynthesis, and tissue and skeletal growth in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 296, n. 2, p. 145–166, 2003.
- HOWEY, R. L. **Welcome to the Wonderfully Weird World of Rotifers**. [s. l.], 1999. Disponível em: <http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/indexmag.html?http://www.microscopy-uk.org.uk/mag/artnov99/rotih.html>. Acesso em: 30 mar. 2020.
- HUNT, J.; SHARP, W. Developing a Comprehensive Strategy for Coral Restoration for Florida. **Tallahassee Florida Fish and Wildlife Conservation Commission**, [S. l.], v. State Wild, p. 93, 2014.
- HURLBERT, S. Pseudoreplication and the design of ecological field experiments. **Ecological monographs**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 187–211, 1984.
- IGLESIAS-PRIETO, R. *et al.* Photosynthetic response to elevated temperature in the symbiotic dinoflagellate *Symbiodinium microadriaticum* in culture. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S. l.], v. 89, n. 21, p. 10302–10305, 1992.
- JAAP, W. C. Coral reef restoration. **Ecological Engineering**, [S. l.], v. 15, n. 3–4, p. 345–364, 2000.
- JIMÉNEZ C, CORTÉS J. Growth of seven species of scleractinian corals in an upwelling environment of the eastern Pacific (Golfo de Papagayo, Costa Rica). **Bull Mar Sci** 72:187–198, 2003.
- JOHNSTON, E. C., FORSMAN, Z. H., FLOT, J. F., SCHMIDT-ROACH, S., PINZÓN, J. H., KNAPP, I. S. S., *et al.* A genomic glance through the fog of plasticity and diversification in *Pocillopora*. **Sci. Rep.** 7, 1–11, 2017.
- JONES, R. J., & HOEGH-GULDBERG, O. Diurnal changes in the photochemical efficiency of the symbiotic dinoflagellates (Dinophyceae) of corals: photoprotection,

photoinactivation and the relationship to coral bleaching. **Plant, Cell & Environment**, 24(1), 89–99, 2001.

JUNBLUT, S.; LIEBICH, V.; BODE-DSLBY, M. **YOUMARES 9 - The Oceans: Our Research, Our Future**. Cham: Springer International Publishing, 2020. *E-book*.

KANO, K., KAMINO, K., LELEO, G., ADACHI, K., & SHIZURI, Y.. Pseudoalterobactin A and B, New Siderophores Excreted by Marine Bacterium Pseudoalteromonas sp. KP20-4. **The Journal of Antibiotics**, 56(10), 871–875, 2003.

KAVOUSHI, J.; PARKINSON, J. E.; NAKAMURA, T. Combined ocean acidification and low temperature stressors cause coral mortality. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 903–907, 2016.

KELLOGG, C. A. Microbiomes of stony and soft deep-sea corals share rare core bacteria. **Microbiome**, [S. l.], v. 7, n. 1, p. 90, 2019.

KELLY, L. W. *et al.* Local genomic adaptation of coral reef-associated microbiomes to gradients of natural variability and anthropogenic stressors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 111, n. 28, p. 10227–10232, 2014.

KINZIE III, R.A., JOKIEL, P.L., YORK, R. Effects of light of altered spectral composition on coral zooxanthellae associations and on zooxanthellae in vitro. **Mar. Biol.** 78, 239–248, 1984.

KIRKWOOD, M. *et al.* The opportunistic coral pathogen *Aspergillus sydowii* contains dddP and makes dimethyl sulfide from dimethylsulfoniopropionate. **ISME Journal**, [S. l.], v. 4, n. 1, p. 147–150, 2010.

KNIPP, A. L. *et al.* Contrasting color loss and restoration in survivors of the 2014–2017 coral bleaching event in the Turks and Caicos Islands. **SN Applied Sciences**, [S. l.], v. 2, n. 3, p. 1–11, 2020.

KWON, K.-C., & DANIELL, H.. Oral Delivery of Protein Drugs Bioencapsulated in Plant Cells. **Molecular Therapy**, 24(8), 1342–1350, 2016.

KNOWLTON, N., BRAINARD, R. E., FISHER, R., MOEWS, M., PLAISANCE, L., & CALEY, M. J. (2010). Coral reef biodiversity. **Life in the world's oceans: diversity distribution and abundance**, 65-74.

KUSHMARO, A. *et al.* Bacterial infection and coral bleaching. **Nature**, [S. l.], v. 380, n. 6573, p. 396–396, 1996.

KRAJEWSKA, B. Ureasas I. Functional, catalytic and kinetic properties: A review. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 59(1-3), 9 21, 2009.

KVENNEFORS, E. C. E. *et al.* Regulation of Bacterial Communities Through Antimicrobial Activity by the Coral Holobiont. **Microbial Ecology**, [S. l.], v. 63, n. 3, p. 605–618, 2012.

LALLI, C. M.; PARSONS, T. R. Biological oceanography: an introduction. [S. l.], 1993.

LEAL, M. C. *et al.* Molecular assessment of heterotrophy and prey digestion in zooxanthellate cnidarians. **Molecular Ecology**, [S. l.], v. 23, n. 15, p. 3838–3848, 2013.

- LEMA, K. A.; WILLIS, B. L.; BOURNEB, D. G. Corals form characteristic associations with symbiotic nitrogen-fixing bacteria. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 78, n. 9, p. 3136–3144, 2012.
- LESSER, M. P. Coral reef bleaching and global climate change: Can corals survive the next century? **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 104, n. 13, p. 5259–5260, 2007.
- LESSER, M. P. Coral Bleaching: Causes and Mechanisms. *In: Coral Reefs: An Ecosystem in Transition*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 405–419. *E-book*.
- LEVAS, S. *et al.* Can heterotrophic uptake of dissolved organic carbon and zooplankton mitigate carbon budget deficits in annually bleached corals? **Coral Reefs**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 495–506, 2016.
- LIZCANO-SANDOVAL, L. D.; LONDOÑO-CRUZ, E.; ZAPATA, F. A. Growth and survival of *Pocillopora damicornis* (Scleractinia: Pocilloporidae) coral fragments and their potential for coral reef restoration in the Tropical Eastern Pacific. **Marine Biology Research**, [S. l.], v. 14, n. 8, p. 887–897, 2018.
- LU, W. *et al.* Late inception of a resiliently oxygenated upper ocean. **Science**, [S. l.], v. 361, n. July, p. 174–177, 2018.
- LUBZENS, E. Raising rotifers for use in aquaculture. *In: Rotifer Symposium IV*. Dordrecht: Springer Netherlands, p. 245–255, 1987.
- LUBZENS, E.; MINKOFF, G.; MAROM, S. Salinity dependence of sexual and asexual reproduction in the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Marine Biology**, [S. l.], v. 85, n. 2, p. 123–126, 1985.
- LUBZENS, E.; TANDLER, A.; MINKOFF, G. Rotifers as food in aquaculture. **Hydrobiologia**, [S. l.], v. 186–187, n. 1, p. 387–400, 1989.
- LUBZENS, E.; ZMORA, O. Production and Nutritional Value of Rotifers. *In: Live Feeds in Marine Aquaculture*. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd, p. 17–64, 2003.
- LUBZENS, E.; ZMORA, O.; BARR, Y. Biotechnology and aquaculture of rotifers. [S. l.], p. 337–353, 2001.
- MAGRIS, R. A.; GIARRIZZO, T. Mysterious oil spill in the Atlantic Ocean threatens marine biodiversity and local people in Brazil. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 153, p. 110961, 2020.
- MAINA, J. *et al.* Human deforestation outweighs future climate change impacts of sedimentation on coral reefs. **Nature Communications**, [S. l.], v. 4, n. May, p. 1–7, 2013.
- MAKRIDIS, P. *et al.* Colonization of the gut in first feeding turbot by bacterial strains added to the water or bioencapsulated in rotifers. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 8, n. 5, p. 367–380, 2000.
- Manickam, N., Bhavan, P. S., Santhanam, P., & Muralisankar, T. Influence of wild mixed zooplankton on growth and muscle biochemical composition of the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* post larvae. *Aquaculture*, 735110, 2020.
- MANFRA, L. *et al.* Comparative ecotoxicity of polystyrene nanoparticles in natural seawater and reconstituted seawater using the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S. l.], v. 145, n. May, p. 557–563, 2017.

- MANZELLO, D. P. Coral growth with thermal stress and ocean acidification: Lessons from the eastern tropical Pacific. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 749–758, 2010.
- MANZELLO, D. P.; EAKIN, C. M.; GLYNN, P. W. Effects of Global Warming and Ocean Acidification on Carbonate Budgets of Eastern Pacific Coral Reefs. [S. l.], v. 8, p. 291–314, 2017.
- MARKEY, K. *et al.* Insecticides and a fungicide affect multiple coral life stages. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 330, p. 127–137, 2007.
- MARTÍNEZ-DÍAZ, S. F. *et al.* Elimination of the associated microbial community and bioencapsulation of bacteria in the rotifer *Brachionus plicatilis*. **Aquaculture International**, [S. l.], v. 11, n. 1, p. 95–108, 2003.
- MARUYAMA, I.; HIRAYAMA, K. The Culture of the Rotifer *Brachionus plicatilis* with *Chlorella vulgaris* Containing Vitamin B 12 in its Cells. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], v. 24, n. 2, p. 194–198, 1993.
- MAYHEW, P. J. *et al.* Biodiversity tracks temperature over time. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 109, n. 38, p. 15141–15145, 2012.
- MCLACHLAN, R. H. *et al.* Thirty years of coral heat-stress experiments: a review of methods. **Coral Reefs**, [S. l.], 2020.
- MEEHL, G. A. *et al.* How much more global warming and sea level rise? **Science**, [S. l.], v. 307, n. 5716, p. 1769–1772, 2005.
- MEENATCHI, R., *et al.* Revealing the impact of global mass bleaching on coral microbiome through 16S rRNA gene-based metagenomic analysis PII: S0944-5013(19)31312-6, 2019.
- MENDOZA-BECERRIL, M.; RIVERA-PEREZ, C.; AGÜERO, J. Skeletons of Calcareous Benthic Hydroids (Medusozoa, Hydrozoa) under Ocean Acidification. *In: The Benthos Zone [Working Title]*. [S. l.]: IntechOpen, 2020.
- MEYER, J. L. *et al.* Microbiome shifts and the inhibition of quorum sensing by Black Band Disease cyanobacteria. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 1204–1216, 2016.
- MILLS, S., *et al.* Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (RotíferoRotíferoa, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia*, 796(1), 39-58, 2017.
- MITRANESCU, E. *et al.* Correlação entre parâmetros físico-químicos da água e taxa de sobrevivência de peixes de aquário de *Pterophillum scalare*. **Lucrari Stiintifice - Universitatea de Stiinte Agricole a Banatului Timisoara, Medicina Veterinara**. Vol.43 No.2 pp.170-175 ref.8, 2010.
- MOLLICA, N. R. *et al.* Ocean acidification affects coral growth by reducing skeletal density. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 115, n. 8, p. 1754–1759, 2018.
- MORA, C. A clear human footprint in the coral reefs of the Caribbean. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, [S. l.], v. 275, n. 1636, p. 767–773, 2008.
- MORALES, S. E.; HOLBEN, W. E. Empirical testing of 16S rRNA gene PCR primer pairs reveals variance in target specificity and efficacy not suggested by in silico

analysis. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. I.], v. 75, n. 9, p. 2677–2683, 2009.

MORGANS, C. A., HUNG, J. Y., BOURNE, D. G., & QUIGLEY, K. M. *Symbiodiniaceae* probiotics for use in bleaching recovery. **Restoration Ecology**, 2019.

MORRIS, L. A. *et al.* Nutrient Availability and Metabolism Affect the Stability of Coral–Symbiodiniaceae Symbioses. **Trends in Microbiology**, [S. I.], v. 27, n. 8, p. 678–689, 2019.

MUMBY, P. J. Fishing, Trophic Cascades, and the Process of Grazing on Coral Reefs. **Science**, [S. I.], v. 311, n. 5757, p. 98–101, 2006.

MUROGA, K.; HIGASHI, M.; KEITOKU, H. The isolation of intestinal microflora of farmed red seabream (*Pagrus major*) and black seabream (*Acanthopagrus schlegeli*) at larval and juvenile stages. **Aquaculture**, [S. I.], v. 65, n. 1, p. 79–88, 1987.

MUSCATINE, L. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in coral reefs. p.75-87. In: Z. Dubinsky (ed) **Ecosystems of the World**, 25. Coral Reefs. Elsevier Science Publishing Company, Inc. Amsterdam, The Netherlands, 550 p., 1990.

MUSCATINE, L.; PORTER, J. W. Reef Corals: Mutualistic Symbioses Adapted to Nutrient-Poor Environments. **BioScience**, [S. I.], v. 27, n. 7, p. 454–460, 1977.

NATIONAL ACADEMIES OF SCIENCES AND MEDICINE, E. A Research Review of Interventions to Increase the Persistence and Resilience of Coral Reefs. **The National Academies Press**, 2019.

NEDELJKA, R.; RÉMOND, C.; MELLO-ATHAYDE, M. A. Differential impact of heat stress on reef-building corals under different light conditions. **Marine Environmental Research**, [S. I.], v. 158, p. 104947, 2020.

NG, W.-L.; BASSLER, B. L. Bacterial Quorum-Sensing Network Architectures. **Annual Review of Genetics**, [S. I.], v. 43, n. 1, p. 197–222, 2009.

NICOLAS, J. L.; ROBIC, E.; ANSQUER, D. Bacterial flora associated with a trophic chain consisting of microalgae, rotifers and turbot larvae: Influence of bacteria on larval survival. **Aquaculture**, [S. I.], v. 83, n. 3–4, p. 237–248, 1989.

OLSON, N. D. *et al.* Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian Montipora corals: Diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. I.], v. 371, n. 2, p. 140–146, 2009.

OMORI, M. Degradation and restoration of coral reefs: Experience in Okinawa, Japan. **Marine Biology Research**, [S. I.], v. 7, n. 1, p. 3–12, 2011.

PALARDY, J. E.; GROTTOLI, A. G.; MATTHEWS, K. A. Effect of naturally changing zooplankton concentrations on feeding rates of two coral species in the Eastern Pacific. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. I.], v. 331, n. 1, p. 99–107, 2006.

PALARDY, J. E.; RODRIGUES, L. J.; GROTTOLI, A. G. The importance of zooplankton to the daily metabolic carbon requirements of healthy and bleached corals at two depths. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. I.], v. 367, n. 2, p. 180–188, 2008 a.

PALARDY, J. E.; RODRIGUES, L. J.; GROTTOLI, A. G. The importance of

zooplankton to the daily metabolic carbon requirements of healthy and bleached corals at two depths. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 367, n. 2, p. 180–188, 2008 b.

PALARDY, J.; GROTTOLI, A.; MATTHEWS, K. Effects of upwelling, depth, morphology and polyp size on feeding in three species of Panamanian corals. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 300, p. 79–89, 2005.

PANDOLFI, J. M. *et al.* Projecting coral reef futures under global warming and ocean acidification. *science*, 333(6041), 418-422, 2011.

PAPINA, M.; MEZIANE, T.; VAN WOESIK, R. Symbiotic zooxanthellae provide the host-coral *Montipora digitata* with polyunsaturated fatty acids. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, [S. l.], v. 135, n. 3, p. 533–537, 2003.

PEARSE, V. B.; MUSCATINE, L. ROLE OF SYMBIOTIC ALGAE (ZOOXANTHELLAE) IN CORAL CALCIFICATION. **The Biological Bulletin**, [S. l.], v. 141, n. 2, p. 350–363, 1971.

PEIXOTO, R. S. *et al.* Beneficial microorganisms for corals (BMC): Proposed mechanisms for coral health and resilience. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 8, n. MAR, p. 1–16, 2017.

PÉREZ BENAVENTE, G.; GATESOUBE, F.-J. The continuous distribution of rotifers increases the essential fatty acid reserve of turbot larvae, *Scophthalmus maximus*. **Aquaculture**, [S. l.], v. 72, n. 1–2, p. 109–114, 1988.

PINZÓN, J. H.; LAJEUNESSE, T. C. Species delimitation of common reef corals in the genus *Pocillopora* using nucleotide sequence phylogenies, population genetics and symbiosis ecology. **Molecular Ecology**, [S. l.], v. 20, n. 2, p. 311–325, 2011.

PLANAS, M.; CUNHA, I. Larviculture of marine fish: problems and perspectives. **Aquaculture**, [S. l.], v. 177, n. 1–4, p. 171–190, 1999.

QUIGLEY, K.; BAY, L.; WILLIS, B. Leveraging new knowledge of Symbiodinium community regulation in corals for conservation and reef restoration. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 600, p. 245–253, 2018.

R CORE TEAM. R. A Language and Environment for Statistical Computing. **R Foundation for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2020.

RAINA, J.-B. *et al.* Isolation of an antimicrobial compound produced by bacteria associated with reef-building corals. **PeerJ**, [S. l.], v. 4, p. e2275, 2016.

REAKA-KUDLA, M. L. The global biodiversity of coral reefs: a comparison with rain forests. *Biodiversity II: Understanding and protecting our biological resources*, 2, 551, 1997

READ SEA. **Catálogo de produtos Red Sea**, 2014. Visualizado em 15 de julho de 2020.

REBOLLEDO, U. A., NANDINI, S., SÁNCHEZ, O. E., SARMA, S. Combined effects of temperature and salinity on the demographic response of *Proales similis* (Beauchamp, 1907) and *Brachionus plicatilis* (Müller, 1786). **Chemosphere**, 202, 312-321, 2018.

REIS, L.G.V; RODRIGUES, A.A.; SOARES, R.S.; ARAUJO, R.C.; VIEIRA, J.D.G. Bioprecipitação de carbonato de cálcio por bactérias ureolíticas e suas aplicações.

- Enciclopédia biosfera, Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.14 n.26; p. 2017 860
- RIEGL, B.; BRUCKNER, A.; COLES, S.L.; RENAUD, P.; DODGE, R.E. Coral reefs: threats and conservation in an era of global change. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1162, 136-186, 2009.
- RINGØ, E. *et al.* The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. **Journal of Applied Bacteriology**, [S. l.], v. 81, n. 2, p. 207–211, 1996.
- RINKEVICH, B. Conservation of coral reefs through active restoration measures: Recent approaches and last decade progress. **Environmental Science and Technology**, [S. l.], v. 39, n. 12, p. 4333–4342, 2005.
- RINKEVICH, B. Rebuilding coral reefs: Does active reef restoration lead to sustainable reefs? **Current Opinion in Environmental Sustainability**, [S. l.], v. 7, p. 28–36, 2014.
- RITCHIE, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 322, p. 1–14, 2006.
- RITSON-WILLIAMS, R. *et al.* Larval settlement preferences and post-settlement survival of the threatened Caribbean corals *Acropora palmata* and *A. cervicornis*. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 29, n. 1, p. 71–81, 2010.
- RIVADENEYRA, M. A. *et al.* Biomineralization of carbonates by *Halobacillus trueperi* in solid and liquid media with different salinities. **FEMS Microbiology Ecology**, [S. l.], v. 48, n. 1, p. 39–46, 2004.
- RODRÍGUEZ, M. P.; MATSUMURA-TUNDISI, T. Variation of density, species composition and dominance of Rotifers at a shallow tropical reservoir (Broa reservoir, SP, Brazil) in a short scale time. **Revista Brasileira de Biologia**, [S. l.], v. 60, n. 1, p. 01–09, 2000.
- ROHWER, F. *et al.* Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 243, p. 1–10, 2002.
- ROSADO, P. M. *et al.* Marine probiotics: increasing coral resistance to bleaching through microbiome manipulation. **ISME Journal**, [S. l.], v. 13, n. 4, p. 921–936, 2019.
- ROSENBERG, E. *et al.* The role of microorganisms in coral bleaching. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 139–146, 2009.
- RÖTHIG, T. *et al.* Long-term salinity tolerance is accompanied by major restructuring of the coral bacterial microbiome. **Molecular Ecology**, [S. l.], v. 25, n. 6, p. 1308–1323, 2016.
- ROWAN, R. Thermal adaptation in reef coral symbionts. **Nature**, [S. l.], v. 430, n. 7001, p. 742–742, 2004.
- SALIH, A. *et al.* Fluorescent pigments in corals are photoprotective. **Nature**, [S. l.], v. 408, n. 6814, p. 850–3, 2000.
- SANDERSON, E. W. *et al.* The Human Footprint and the Last of the Wild. **BioScience**, [S. l.], v. 52, n. 10, p. 891, 2002.

- SANG, V. T., *et al.* Coral and Coral-Associated Microorganisms: A Prolific Source of Potential Bioactive Natural Products. *Marine drugs*, 17(8), 468, 2019
- SANTOS, H. F. *et al.* Climate change affects key nitrogen-fixing bacterial populations on coral reefs. **The ISME Journal**, [S. l.], v. 8, n. 11, p. 2272–2279, 2014.
- SCHWYN, B.; NEILANDS, J. B. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 160, n. 1, p. 47–56, 1987.
- SEBENS, K. P. *et al.* Zooplankton capture by two scleractinian corals, *Madracis mirabilis* and *Montastrea cavernosa*, in a field enclosure. **Marine Biology**, [S. l.], v. 127, n. 2, p. 303–317, 1996.
- SEBENS, K. P. *et al.* Water flow and prey capture by three scleractinian corals, *Madracis mirabilis*, *Montastrea cavernosa* and *Porites porites*, in a field enclosure. **Marine Biology**, [S. l.], v. 131, n. 2, p. 347–360, 1998.
- SEEMANN, J. The use of <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N isotope labeling techniques to assess heterotrophy of corals. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 442, p. 88–95, 2013.
- SERA (2020). **Manual: Os aquários de água salgada**. Visualizado em 15 de julho de 2020.
- SILVA, D. P. *et al.* Adaptable mesocosm facility to study oil spill impacts on corals. **Ecology and Evolution**, 2019.
- SHAFIR, S.; VAN RIJN, J.; RINKEVICH, B. Steps in the construction of underwater coral nursery, an essential component in reef restoration acts. **Marine Biology**, [S. l.], v. 149, n. 3, p. 679–687, 2006.
- SHARMA, S.; KULKARNI, J.; JHA, B. Halotolerant Rhizobacteria Promote Growth and Enhance Salinity Tolerance in Peanut. **Frontiers in Microbiology**, [S. l.], v. 7, 2016.
- SHARP, K. H.; RITCHIE, K. B. Multi-partner interactions in corals in the face of climate change. **Biological Bulletin**, [S. l.], v. 223, n. 1, p. 66–77, 2012.
- SHIKUMA, N. J. *et al.* Marine tubeworm metamorphosis induced by arrays of bacterial phage tail-like structures. **Science**, [S. l.], v. 343, n. 6170, p. 529–533, 2014.
- SIEBERT, S.; STEIN, R. Efficacy of ceramic biological filter bricks as a substitute for live rock in land-based coral nurseries. **The Maritime Aquarium at Norwalk**, 10 N. Water St. Norwalk, CT, 06854, 2020.
- SOARES, M. de O. *et al.* Oil spill in South Atlantic (Brazil): Environmental and governmental disaster. **Marine Policy**, [S. l.], v. 115, p. 103879, 2020.
- SOGIN, E. M. *et al.* Metabolomic signatures of increases in temperature and ocean acidification from the reef-building coral, *Pocillopora damicornis*. **Metabolomics**, [S. l.], v. 12, n. 4, p. 1–12, 2016.
- SOROKIN, Y. I. on the Feeding of Some Scleractinian Corals With Bacteria and Dissolved Organic Matter. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 18, n. 3, p. 380–386, 1973.
- SOROKIN, Y. I. **Coral Reef Ecology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. (Ecological Studies). v. 102, 1993.

- SPURGEON, G. IMPROVING THE ECONOMIC EFFECTIVENESS James P. **Bulletin of Marine Science**, [S. l.], v. 69, n. 2, p. 1031–1045, 2001.
- STOCKS-FISCHER, S.; GALINAT, J. K.; BANG, S. S. Microbiological precipitation of CaCO<sub>3</sub>. **Soil Biology and Biochemistry**, [S. l.], v. 31, n. 11, p. 1563–1571, 1999.
- STOLARSKI, J. Three-dimensional micro- and nanostructural characteristics of the scleractinian coral skeleton: a biocalcification proxy. **Acta Palaeontol. Pol.** 4 (3), 497–530, 2003
- SUMMERFIELD, J. A search for quorum quenching compounds in marine bacteria of the Perth Metropolitan area. **Microbiology and Immunology School of Pathology and laboratory medicine**. The University of Western Australia, 2012.
- SULLY, S.; VAN WOESIK, R. Turbid reefs moderate coral bleaching under climate-related temperature stress. **Global Change Biology**, [S. l.], v. 26, n. 3, p. 1367–1373, 2020.
- SWANSON, R.; HOEGH-GULDBERG, O. Amino acid synthesis in the symbiotic sea anemone *Aiptasia pulchella*. **Marine Biology**, [S. l.], v. 131, n. 1, p. 83–93, 1998.
- SWEET, M. J.; BATEMAN, K. S. Reprint of 'Diseases in marine invertebrates associated with mariculture and commercial fisheries'. **Journal of Sea Research**, [S. l.], v. 113, p. 28–44, 2016.
- SWEET, M.; JONES, R.; BYTHELL, J. Coral diseases in aquaria and in nature. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, [S. l.], v. 92, n. 4, p. 791–801, 2012.
- TAIT, K. *et al.* Quorum sensing signal production and inhibition by coral-associated vibrios. **Environmental Microbiology Reports**, [S. l.], v. 2, n. 1, p. 145–150, 2010.
- TANAKA, Y. *et al.* Loss of zooxanthellae in a coral under high seawater temperature and nutrient enrichment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, [S. l.], v. 457, p. 220–225, 2014.
- TAMBUTTÉ, S. *et al.* Coral biomineralization: From the gene to the environment. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, 408(1-2), 58–78, 2011.
- THOMAS, T. *et al.* Complete genome sequence of the halophilic PHA-producing bacterium *Halomonas* sp. SF2003: insights into its biotechnological potential. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 50, 2019.
- THOMPSON, J. R. *et al.* Microbes in the coral holobiont: Partners through evolution, development, and ecological interactions. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, [S. l.], v. 4, n. DEC, p. 1–20, 2014.
- THURBER, R. V. *et al.* Metagenomic analysis of stressed coral holobionts. **Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 2148–2163, 2009.
- TITLYANOV, E. A.; TITLYANOVA, T. V. Reef-building corals - Symbiotic autotrophic organisms: 1. General structure, feeding pattern, and light-dependent distribution in the shelf. **Russian Journal of Marine Biology**, [S. l.], v. 28, n. SUPPL., 2002.
- TORRES, A. F.; RAVAGO-GOTANCO, R. Rarity of the “common” coral *Pocillopora damicornis* in the western Philippine archipelago. **Coral Reefs**, [S. l.], v. 37, n. 4, p. 1209–1216, 2018.
- TOWLE, E. K.; ENOCHS, I. C.; LANGDON, C. Threatened Caribbean coral is able to

mitigate the adverse effects of ocean acidification on calcification by increasing feeding rate. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 10, n. 4, p. 1–17, 2015.

TREMBLAY, P. *et al.* Autotrophic carbon budget in coral tissue: A new <sup>13</sup>C-based model of photosynthate translocation. **Journal of Experimental Biology**, [S. l.], v. 215, n. 8, p. 1384–1393, 2012.

UNEP-WCMC. Review of corals from Indonesia (coral species subject to EU decisions where identification to genus level is acceptable for trade purposes. **UNEP-WCMC**, Cambridge, 2014.

VAN LUNTEREN, P. Comparing coral coverage, growth rates, and growth forms composition on a mineral accretion device during active and inactive periods. [S. l.], p. 19, 2015.

VAN OPPEN, M. J. H. *et al.* Building coral reef resilience through assisted evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [S. l.], v. 112, n. 8, p. 2307–2313, 2015.

VAN OPPEN MJH *et al.* Shifting Paradigms in Restoration of the World's Coral Reefs. *Glob Change Biol.* 2017; 23: 3437–48.

VERBRUGGEN, H.; TRIBOLLET, A. Boring algae. **Current Biology**, [S. l.], v. 21, n. 21, p. R876–R877, 2011.

VERDONCK, L. *et al.* Variability of the Microbial Environment of Rotifer *Brahionis plicatilis* and *Avtemia* Production Systems. **Journal of the World Aquaculture Society**, [S. l.], v. 25, n. 1, p. 55–59, 1994.

VERON, J. E. N., PICHON, M. Scleractinia of Eastern Australia. Part I. Families *Thamnasteriidae*, *Astrocoeniidae*, *Pocilloporidae*. Townsville: Queensland: **Australian Institute of Marine Science**. 86 pp., 166 figs. Monograph Series Volume 1.) Price A\$. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 58, 544–544, 1978.

VERON, J. **Corals of the world**. Townsville: Australian Institute of Marine Science, 2000.

VERON, J. E. N.; PICHON, M. Scleractinia of Eastern Australia. Part I. Families *Thamnasteriidae*, *Astrocoeniidae*, *Pocilloporidae* By J.E.N. Veron and M. Pichon. Townsville: Queensland: Australian Institute of Marine Science, 1976. 86 pp., 166 figs. (Monograph Series. **Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom**, v. 58, n. 2, p. 544–544, 1978.

VINE, N. G.; LEUKES, W. D.; KAISER, H. Probiotics in marine larviculture. **FEMS Microbiology Reviews**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 404–427, 2006.

VREELAND, R. H. *et al.* *Halomonas elongata*, a New Genus and Species of Extremely Salt-Tolerant Bacteria. **International Journal of Systematic Bacteriology**, [S. l.], v. 30, n. 2, p. 485–495, 1980.

WABNITZ, C.; TAYLOR, M. Ornamental species The global trade in marine. **UNEP World Conservation Monitoring Centre**, [S. l.], n. January, p. 64, 2003.

WEBSTER, N. S. *et al.* Metamorphosis of a Scleractinian Coral in Response to Microbial Biofilms. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 2, p. 1213–1221, 2004.

WEI, S. *et al.* Biomineralization processes of calcite induced by bacteria isolated from marine sediments. **Brazilian Journal of Microbiology**, [S. l.], v. 46, n. 2, p. 455–464,

2015

WICKHAM H. *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York. ISBN 978-3-319-24277-4, 2016. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>.

WATSON, C. A., & HILL, J. E. Design criteria for recirculating, marine ornamental production systems. **Aquacultural Engineering**, 34(3), 157–162, 2006.

WICKS, L. C., HILL, R., & DAVY, S. K. The influence of irradiance on tolerance to high and low temperature stress exhibited by Symbiodinium in the coral, *Pocillopora damicornis*, from the high-latitude reef of Lord Howe Island. *Limnology and Oceanography*, 55(6), 2476–2486, 2010.

WILD, C. *et al.* Degradation and mineralization of coral mucus in reef environments. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 267, p. 159–171, 2004.

WILSON, S.; BURNS, K.; CODI, S. Sources of dietary lipids in the coral reef blenny *Salaria patzneri*. **Marine Ecology Progress Series**, [S. l.], v. 222, p. 291–296, 2001.

YAHIEL, G. *et al.* Phytoplankton distribution and grazing near coral reefs. **Limnology and Oceanography**, [S. l.], v. 43, n. 4, p. 551–563, 1998.

YELLOWLEES, D.; REES, T. A. V.; LEGGAT, W. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. **Plant, Cell & Environment**, [S. l.], v. 31, n. 5, p. 679–694, 2008.

YOUNG, C. N.; SCHOPMEYER, S. A.; LIRMAN, D. A review of reef restoration and Coral propagation using the threatened genus *Acropora* in the Caribbean and western Atlantic. **Bulletin of Marine Science**, [S. l.], v. 88, n. 4, p. 1075–1098, 2012.

ZANEVELD, J. R. *et al.* Overfishing and nutrient pollution interact with temperature to disrupt coral reefs down to microbial scales. **Nature Communications**, [S. l.], v. 7, n. May, p. 1–12, 2016.

ZIEGLER, M. *et al.* Coral microbial community dynamics in response to anthropogenic impacts near a major city in the central Red Sea. **Marine Pollution Bulletin**, [S. l.], v. 105, n. 2, p. 629–640, 2016.

ZIKA, J. D. *et al.* Improved estimates of water cycle change from ocean salinity: The key role of ocean warming. **Environmental Research Letters**, [S. l.], v. 13, n. 7, 2018.

## 9. ANEXO

**Artigo 1:** Publicado em Jove Journal

### **Prospecting Microbial Strains for Bioremediation and Probiotics Development for Metaorganism Research and Preservation**

Helena D. M. Villela<sup>1</sup>, Caren L. S. Vilela<sup>1</sup>, Juliana M. Assis<sup>1</sup>, Natascha Varona<sup>2</sup>, Camille Burke<sup>2</sup>, David A. Coil<sup>2</sup>, Jonathan A. Eisen<sup>2</sup>, Raquel S. Peixoto<sup>1,2,3</sup>

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

<sup>2</sup>Genome Center, University of California, Davis

<sup>3</sup>IMAM-AquaRio - Rio de Janeiro Aquarium Research Center

#### **Summary**

Pollution affects all biomes. Marine environments have been particularly impacted, especially coral reefs, one of the most sensitive ecosystems on Earth. Bioremediation is the capacity of organisms to degrade contaminants. Here, we describe methodologies to isolate and test microbes presenting bioremediation ability and potential probiotic characteristics for corals.

#### **Abstract**

Pollution affects all biomes. Marine environments have been particularly impacted, especially coral reefs, one of the most sensitive ecosystems on Earth. Globally, 4.5 billion people are economically dependent on the sea, where most of their livelihood is provided by coral reefs. Corals are of great importance and therefore their extinction leads to catastrophic consequences. There are several possible solutions to remediate marine pollutants and local contamination, including bioremediation. Bioremediation is

the capacity of organisms to degrade contaminants. The approach presents several advantages, such as sustainability, relatively low cost, and the fact that it can be applied in different ecosystems, causing minimal impacts to the environment. As an extra advantage, the manipulation of endogenous microbiomes, including putative beneficial microorganisms for corals (pBMCs), may have probiotic effects for marine animals. In this context, the use of the two approaches, bioremediation and pBMC inoculation combined, could be promising. This strategy would promote the degradation of specific pollutants that can be harmful to corals and other metaorganisms while also increasing host resistance and resilience to deal with pollution and other threats. This method focuses on the selection of pBMCs to degrade two contaminants: the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and crude oil. Both have been reported to negatively impact marine animals, including corals, and humans. The protocol describes how to isolate and test bacteria capable of degrading the specific contaminants, followed by a description of how to detect some putative beneficial characteristics of these associated microbes to their coral host. The methodologies described here are relatively cheap, easy to perform, and highly adaptable. Almost any kind of soluble target compound can be used instead of EE2 and oil.

## **Introduction**

Pollution is a major issue affecting human, animal, and plant health worldwide. Although pollution can be natural, such as volcanic ashes<sup>1</sup>, human activities are the primary cause of most pollution. Anthropogenic activities are contaminating soil, water, and air, which directly or indirectly lead to almost 20 million premature human

deaths<sup>2</sup> and decimate billions of other forms of life annually. Pollutants are present even in the most remote areas of the planet. For instance, heavy metals and persistent organic compounds have been detected in deep sea invertebrates and polar mammals, respectively<sup>3,4</sup>.

Marine environments have been especially impacted by pollution. For a long time, it was assumed that the ocean would remain unaffected and supply an endless source of goods because of its massive volume of water<sup>5</sup>. For this reason, all types of industry and institutions freely released waste in water bodies for centuries<sup>6,7</sup>. Several contaminants of all types, such as plastic<sup>8</sup>, synthetic hormones<sup>9</sup>, pesticides<sup>10</sup>, oil<sup>11</sup>, nutrients<sup>12</sup>, heavy metals<sup>3</sup>, and radioactive waste<sup>13</sup> have been reported as impacting ocean ecosystems. In this context, coral reefs are among the most important and sensitive ecosystems in marine environments<sup>14</sup>. Reefs are coastal protectors, crucial to the development of thousands of marine species by playing essential roles in nutrients cycling and climate control. Reefs also contribute to the economy by providing fish, goods, and tourism, among others<sup>15</sup>. For instance, 4.5 billion people depend on ocean fish as their main food source<sup>16</sup>, which are greatly supported by coral reefs.

Regardless of their ecological, social, and economic importance, coral reefs are being decimated<sup>17,18</sup>. Anthropogenic activities are primarily responsible for contributing to the three main causes of corals' death: climate change, overfishing, and water pollution<sup>19</sup>. Even though it is important to work on the mitigation of global warming, it is also important to work on minimizing local contamination, including water pollution, that can critically contribute to coral decline<sup>20</sup>. Thus, there is an urgent need for the

development of strategies to increase corals' lifetime, which could provide them with extra time to adapt and survive.

In this regard, it is extremely important to find solutions to minimize contamination and to develop strategies to increase the fitness of corals. Strategies to remediate marine pollutants are highly diverse and can be grouped into physical, chemical, and biological approaches. Physical approaches are helpful. However, they are not always efficient. For instance, plastic waste can be minimized by physical removal, while water-soluble compounds need other methodologies to be eliminated. Examples of such compounds are crude oil, released by oil industry activities and spills, as well as other micropollutants, such as synthetic hormones, normally used as the estrogenic component in oral contraceptives and present in sewage<sup>21,22</sup>. The use of chemical substances to decrease contamination can solve a specific problem, but it may also represent an extra source of pollution. This is the case with chemical dispersants to mitigate oil contamination, which have been described as even more toxic to marine ecosystems than the oil contamination itself<sup>23</sup>. For these reasons, biological approaches present several advantages when compared to the other methods. Bioremediation is the capacity of living organisms, or their metabolic products, to transform contaminants into less toxic or non-toxic forms<sup>24</sup>. The main advantages of using biological methods are sustainability, relative low cost, the fact they are ecologically friendly, and that they can be applied in different ecosystems, causing minimal or fewer impacts to the environment<sup>21,25,26,27</sup>.

Additionally, the manipulation of the microbial community present in an environment allows an extra potential advantage. There are microbiomes that are associated with hosts and are essential to their health. It is well known that these associated symbiotic microbiomes are necessary to maintain host homeostasis<sup>19</sup>. The manipulation of these associated microorganisms has been well explored for hosts such as plants and mammals<sup>28,29</sup>, but the use of coral probiotics is still novel<sup>15</sup>. Corals also host, interact with, and depend on large and specific populations of microorganisms to survive<sup>19</sup>. The role of these microbial communities in the health and dysbiosis of corals is under active study, but it is still far from being fully understood<sup>30</sup>. One of the most popular hypotheses is called the coral probiotic hypothesis. It suggests the existence of a dynamic relationship between symbiotic microorganisms and environmental conditions which brings about the selection of the most advantageous coral metaorganisms<sup>31</sup>. Based on this information, key potential probiotic mechanisms, as well as the strategies for isolation, manipulation, and delivery of beneficial microorganisms for corals (BMCs) for several purposes, were proposed<sup>32</sup> and tested<sup>33</sup>. These potential beneficial characteristics include resistance to temperature increase, protection from reactive oxygen species (ROS), nitrogen fixation, resistance to contaminants, and biological control against pathogens, among others<sup>32</sup>.

This study focuses on the selection of BMCs and free-living microorganisms presenting the ability to degrade two contaminants commonly found in marine environments: the synthetic estrogen 17 $\alpha$ -ethinylestradiol (EE2) and crude oil. Pollutants containing hormone active agents are often present in water bodies<sup>34,35,36,37,38,39,40,41,42</sup>. Among

them, synthetic estrogenic endocrine-disruptor compounds (EDCs) mimic the action of estrogens on target cells, causing several impacts on animals, including breast cancer, infertility, and hermaphroditism<sup>9</sup>. EE2 is excreted by humans because of the use of oral contraceptives. It is not removed from sewage by traditional wastewater-treatment plants and has negative effects even at very low concentrations (e.g., ng/L or µg/L)<sup>43,44,45</sup>. Little is known about the effects of estrogens on coral physiology<sup>46,47</sup>. However, on other marine invertebrates, such as sponges, crustaceans, and mollusks, estrogens were reported to cause several negative effects mainly related to reproduction, such as development and/or stimulation of gametes, alteration in enzymatic and protein actions, problems in embryonic processes, and others<sup>48,49,50,51,52</sup>. The negative consequences caused by EE2 contamination highlight the necessity to develop sustainable approaches to remove this compound from the environment without impacting marine life.

In parallel, with oil currently accounting for almost 40% of the world's consumed energy sources<sup>53</sup>, chronic contamination and oil spills often occur near reef areas<sup>11</sup>. Oil contamination was reported to cause negative effects in several species of marine animals, birds, plants, and humans<sup>54,55,56,57</sup>. On corals, it causes bleaching, reduces the resistance of larvae to thermal stress<sup>58</sup>, disrupts the microbial associated communities<sup>21</sup>, and causes tissue necrosis. In addition, chemical dispersants, an oil remediation technique commonly used by oil companies to remediate spills, are even more toxic to corals than the oil itself<sup>23</sup>. Beneficial microorganisms isolated from corals, in contrast, are known for playing crucial roles on host health. However, the

manipulation of these potential probiotics must be better explored in order to investigate possible negative side effects and the metabolic capacities that can be screened to improve the fitness of the metaorganism. In this context, characteristics such as the antimicrobial activity against coral pathogens, the production of catalase to fight oxidative stress, the ability to degrade urea (which may have important roles in the calcification process), and the presence of genes that confer potential beneficial characteristics, among others, must be the focus of investigation. Here, we show how bioremediation and probiotics can be used to concomitantly mitigate the impacts of pollution and enhance coral health. The development of innovative approaches that can be used as interventions to increase marine species persistence represent a step towards a more sustainable and healthier planet.

## **Protocol**

### 1. Water and coral collection and storage for microbial isolation

NOTE: It is essential to take the coordinates and temperature of the sampling sites. If possible, metadata such as salinity, pH, depth, and light intensity can also help in finding fine-tuned cultivation approaches and future interpretation of data. For reliable results, keep the samples stored for the minimum length of time possible. The water/coral microbiomes may change considerably if the samples are not kept at the right temperature and/or are stored for long periods. If the isolation step is not performed instantly after collection, it is crucial to maintain samples at 4 °C until

processing. The longer the samples are stored, even at 4 °C, the more the microbial community will change.

1. Sample and store seawater.
  1. Collect 500 mL samples of water in at least triplicate from each targeted sampling site. Preferably use sterile bottles with screw caps.
  2. If processing the water instantly after collection, keep the bottles at RT for a short interval. If sample processing is happening later, keep the bottles at 4 °C.
  
2. Sample and store the coral.
  1. Use a sterile pair of pliers to cut coral fragments from the same sampling site of the water samples. To avoid contamination, touch corals only with sterile gloves.
  2. Rinse the sampled coral fragment using 20 mL sterile saline solution (3% NaCl in distilled water) or artificial seawater to get rid of the loosely attached free-living bacteria of the seawater.
  3. Using forceps, place each coral fragment into a sterile 250–500 mL container with a screw cap containing sterile saline solution.
  4. In the laboratory, using sterile forceps and pliers, weigh 5 g of coral fragments using sterile 100 mm x 20 mm Petri dishes on a weighing scale.
  5. Transfer the 5 g of coral sample to a sterile mortar and macerate it using a sterile pestle.
  6. Using a sterile spatula, transfer the macerated sample to a sterile culture flask containing 45 mL of 3% NaCl sterile solution and 10–15 glass beads of 5 mm. Use some of the 45 mL sterile saline solution to wash the mortar and recover the maximum amount of the macerate.
  7. Keep the flasks under constant agitation (150 x g) for 16 h at the water temperature of the sampling site.  
NOTE: For shallow-water corals the optimum temperature will range from 24–28 °C. This step will detach microorganisms from different coral compartments, such as the ones attached to the host cells, or the ones living inside the tissue and the skeleton. After this step, the coral macerates should not be stored, and the isolation step must be instantly performed.

## 2. Isolation of EE2-degrading bacteria from seawater and/or corals

### 1. Select bacteria.

NOTE: After steps 1.1.2 and 1.2.7, the concentration of microorganisms in seawater that have detached from the different coral macerates will be unknown and variable. In order to guarantee the isolation of individual microbial colonies in Petri dishes containing agar media, serial dilutions are needed.

1. Perform serial dilutions up to  $10^{-9}$  in sterile saline solution for coral samples and up to  $10^{-6}$  for water samples. Pipette dilutions up and down

5x before discarding the tip. Vortex samples for 5 s every time before performing the next serial dilution.

2. Pipette 100  $\mu\text{L}$  of each dilution on Petri dishes containing 3% NaCl lysogeny broth (LB) agar medium, and plate them. NOTE: Use marine agar (MA) as an alternative medium. Triplicates of each dilution are required for reliable results.
3. Incubate the plates for 1–3 days at the target temperature (e.g., 26 °C). Check the plates once a day.
4. Select and isolate the colonies presenting distinct growth morphologies on new plates using the streak plate technique. Repeat this step as many times as needed to have pure colonies growing on the plates.
5. If the procedure is not instantly continued to step 2.3.1, store isolates at 4 °C or in glycerol as described in section 2.2.

## 2. Prepare glycerol stocks.

NOTE: This step is optional and can be used for long-term bacterial stocks storage.

1. Pick single colonies from the fresh plate or from the plates stored at 4 °C and independently inoculate them in 2 mL of sterile LB medium.
2. Place tubes under constant agitation (150 x *g*) at 24–28 °C overnight (ON).
3. Add 1 mL of the bacterial cultures from step 2.2.2 and sterile glycerol to a final concentration of 20% to the 2 mL cryovials.
4. Leave the cryovials ON at 4 °C.
5. Place the glycerol bacterial stocks at -80 °C until needed.

## 3. Perform the EE2-degradation ability test.

1. Activate the isolates in LB broth or alternative media. For this, pick a single colony from the fresh plates or the plate stored at 4 °C, and inoculate 2 mL of sterile LB medium. In case it is a glycerol stock, first streak it on LB agar plates and incubate at 24–28 °C ON to have single colonies growing. Place the tube containing LB medium inclined under constant agitation (150 x *g*) at 24–28 °C ON.
2. After bacterial growth, pellet the cells by centrifuging them at 8,000 x *g* for 8 min at room temperature (RT). Discard the supernatant and, gently pipetting up and down, resuspend the cells in an equal volume (2 mL) of saline water to wash the remaining LB broth.
3. Repeat step 2.3.2 twice to guarantee that there are no traces of carbon source, resuspending the cells in an equal volume of saline solution. For instance, if it was started with a 2 mL culture, resuspend the cells in a final volume of 2 mL saline solution.
4. Inoculate the washed and resuspended cells in minimum Bushnell Haas culture medium (BH Broth) containing EE2 as the only carbon source<sup>59</sup>. NOTE: EE2 is dissolved in ethanol at a final concentration of 5 mg/L in the culture medium. Make changes in the pollutant type and/or concentration if needed.
5. Assess bacterial growth by optical density at 600 nm and/or colonies forming units (CFU) on LB agar medium<sup>33</sup>, for 16–72 h of incubation. NOTE: Alternatively, the microorganisms can be directly isolated on

minimum media containing EE2, or other compounds, as the only carbon source. This step would direct the selection and avoid undesirable growth.

#### 4. Isolation of oil-degrading bacteria from seawater and/or corals

1. Prepare minimum media containing an oil water-soluble fraction (oWSF) and oil water-insoluble fraction (oWIF) as the only carbon source<sup>21</sup>.
  1. Add 1–2% crude oil to 500 mL of sterile distilled water. Use a filter flask opened on the bottom to take the soluble fraction out without disturbing the upper layer of the insoluble fraction.
  2. Keep the mixture under constant agitation at 24–28 °C at 150 x *g* for 48 h.
  3. Place the filter flask containing the crude oil fractions on a stable surface and wait 10–20 min to allow soluble and insoluble fraction separation.
  4. Transfer the oWSF to a new sterile flask, saving the oWIF by opening the bottom filter flask and taking out the soluble fraction.
  5. Using all the oWSF recovered in the previous step (~400 mL), prepare 1 L of BH agar minimum medium containing oWSF as the only carbon source.
  6. Using the oWIF remaining in the flask from step 3.1.4, prepare 1 L of BH agar minimum medium containing oWIF as the only carbon source.
2. Isolate oWSF- and oWIF-degrading bacteria.
  1. Using water and coral macerate from steps 1.1.2 and 1.2.7, respectively, dilute the samples up to 10<sup>-6</sup> in sterile saline solution as described in step 2.1.1.
  2. Pipette 100 µL of each dilution on Petri dishes containing BH-oWSF and BH-oWIF agar media and plate them.
  3. Repeat the procedures described from step 2.1.3 to step 2.1.5.

#### 4. Consortium member selection

1. Extract and sequence the DNA for taxonomic identification.
  1. Activate the isolates stocked in glycerol as described in step 2.3.1.
  2. Extract the DNA using a DNA extraction kit (see **Table of Materials**).
  3. Use primers 27f (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') and 1492r (5'-GTT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') for amplification of the 16S rRNA gene.
  4. Perform 50 µL PCR reactions according to the following protocol: 5 µL of 10x polymerase buffer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM dNTPs, 5 mM of each primer, 10 ng of genomic DNA, and 2.5 U of Taq DNA polymerase. Add negative controls (i.e., blank DNA extractions and PCR reactions without template DNA) to ensure that there is no contamination.
  5. Set up the following thermal cycling steps: a first denaturation cycle at 94 °C for 4 min; 35 cycles at 94 °C for 1 min, followed by 50 °C for 1 min, and 72 °C for 2.5 min; a final extension cycle for 10 min at 72 °C.
  6. Check amplicon integrity in 1.2% agarose gel using 80 V.

7. Gel purify the samples using a gel purification kit (see **Table of Materials**).
8. Quantify PCR products using a fluorometer.
9. Send product for sequencing.

NOTE: For better taxonomical classifications, the Sanger method is recommended<sup>60</sup>, because it provides long sequences. The universal primers 27f and 1492r can be used to amplify nearly the entire length of the 16S rRNA gene<sup>61</sup>. If contigs cannot be assembled using one pair of primers, an extra pair in the middle of the sequence should be considered.

5. Determine the growth curve.
  1. Activate the isolates in glycerol stocks from step 2.2.5 as described in step 2.3.1 but using 5 mL instead of 2 mL.
  2. Add 1% (v/v) of the grown 5 mL culture from step 4.2.1 in triplicates, to a 250 mL flask containing 100 mL of 3% LB media. Make sure to prepare triplicates of a negative control (no inoculum) as well.
  3. Place the flasks in an incubator under constant agitation (150 x g) at 24–28 °C.
  4. Take 1 mL aliquots every 4 h for 48 h. If the strains present a high growth rate, decrease the 4 h interval.
  5. Measure the optical density (OD) estimation at 600 nm wavelength and colony forming units (CFU) counted from serial dilutions plated on rich media plates (100 µL should be inoculated in each plate and normalized to the volume of 1 mL).
  6. Plot the OD and CFU curves and analyze the correlation of OD/CFU of each individual strain. From now on, calculate the number of cells based on the OD values.
6. Perform antagonism test.
  1. Activate the isolates as described in step 2.3.1.
  2. Inoculate one strain at a time along the middle of plates containing agar media and the other ones perpendicular to the central one. Repeat until every selected microbial strain is tested against all others.
  3. Incubate the plates at 24–28 °C and monitor them daily in order to observe potential halos indicating antagonistic activity. If halos are observed indicating antagonistic activity between two strains, one of them should be excluded.
7. Perform consortium assembly.
  1. Activate the isolates as described in step 2.3.1.
  2. Pellet the cells at 3,500 x g and gently wash them 2x in an equal volume of saline solution. Resuspend the cells in an equal volume (i.e., if the final volume was 2 mL of cells, wash them using 2 mL of saline solution and resuspend them in a final volume of 2 mL).
  3. Inoculate 1 mL culture in 100 mL 3% NaCl LB medium and incubate ON at 150 x g.
  4. Repeat step 4.5.2, inoculate the 100 mL grown, washed, and resuspended cultures in 10 L cultures. Incubate ON in sterile air-lift

bioreactors, receiving filtered air from a pump. If more culture is needed, always inoculate 1% of grown culture in fresh media.

5. Centrifuge grown cultures at 8,000 x g for 8 min at 4 °C. Discard supernatant after centrifugation.
6. Wash the pellet, gently resuspending the cells in 500 mL of sterile saline solution.
7. Repeat steps 4.5.5 and 4.5.6.
8. Resuspend each individual culture in 100 mL of saline solution and measure the OD to estimate the number of cells.
9. Calculate the volume of each culture necessary to reach a final concentration of  $10^7$  cells mL<sup>-1</sup>.
10. Perform CFU counts on rich media for a final confirmation of cell viability and concentration.
11. Mix an equal volume of each individual culture in sterile flasks and aliquot the consortium into 50 mL sterile tubes.
12. Keep at 4 °C until inoculation.

NOTE: Prepare the consortium assembly as fresh as possible to guarantee cells will still be viable. Alternatively, CFU counts can be performed before inoculation. To assemble an ideal consortium, it is necessary to use isolates presenting different and complementary metabolic capacities. Usually, 6–10 isolates are used to form consortia, but this number will vary depending on the members' characteristics and purposes.

#### 8. Detection of putative beneficial characteristics for corals

1. Activate the isolates from the glycerol stocks by streaking them on LB agar plates and incubating them at 24–28 °C ON to have single colonies growing. Pick a single colony from the plates and inoculate it in 2 mL of sterile LB medium. Place tube containing LB medium inclined under constant agitation (150 x g) at 24–28 °C ON.
2. Perform DNA extraction as described in section 4.1 for detection of potentially beneficial genes by PCR.

NOTE: PCR reaction conditions and primers will depend on the targeted gene. Methodologies to test BMC characteristics of individual strains and PCR detection for potentially beneficial genes are described in **Table 1**.

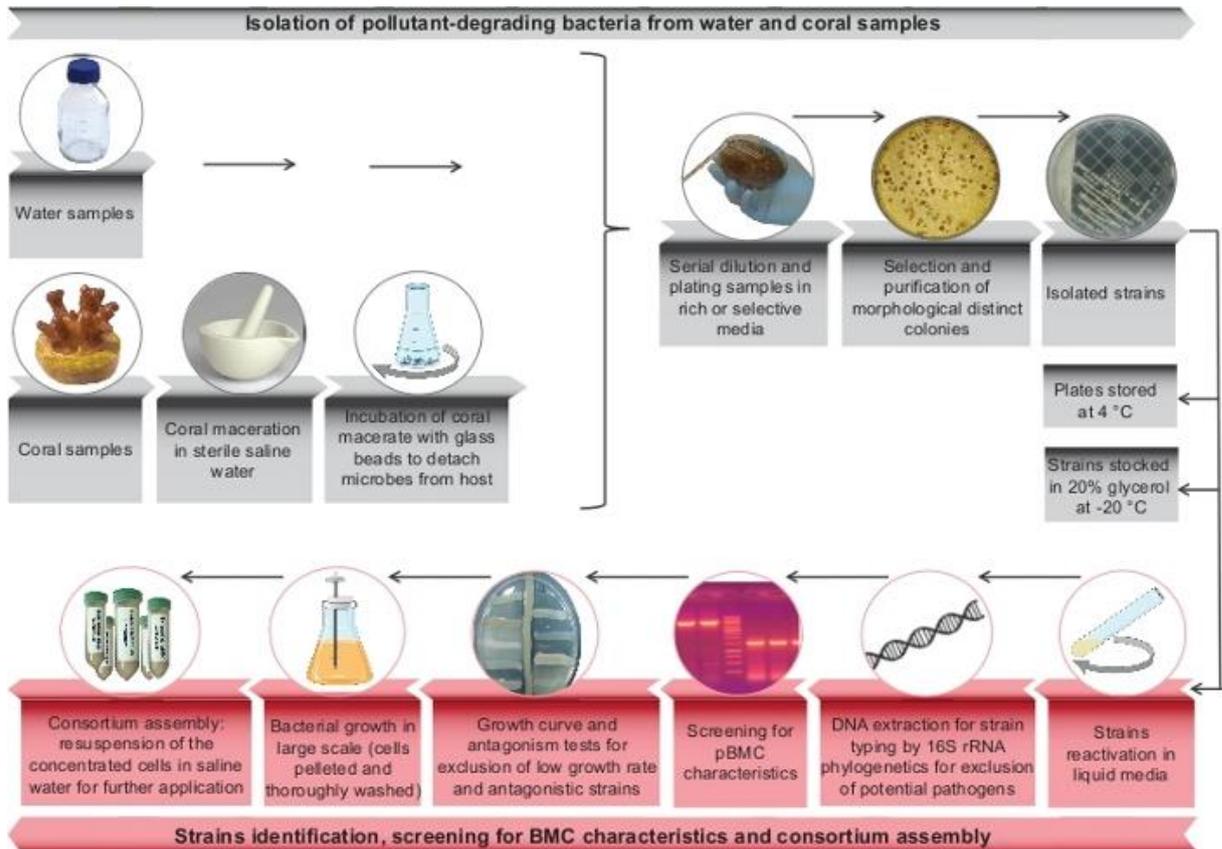
### Representative Results

Based on the methods described here, it was possible to isolate microorganisms from different water sources and coral nubbins presenting putative BMC characteristics and capable to degrade different classes of contaminants (**Figure 1**). Using water samples

collected at a sewage treatment plant, obtained from CESA-UFRJ (Experimental Center of Environmental Sanitation of the Federal University of Rio de Janeiro), and based on the procedure presented here, 33 bacterial strains able to degrade EE2 at a final concentration of 5mg/L were isolated (**Figure 2A**). Additionally, using the technique for selecting oil-degrading bacteria, 20 strains able to degrade both oWSF (**Figure 2B**) and oWIF (**Figure 2C**) were isolated.

Putative BMC characteristics were screened in microorganisms isolated from different coral species under diverse conditions. Among them, a strain presenting strong antagonistic activity against the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* (**Figure 3A**), strains able to degrade urea (**Figure 3B**), a good catalase producer (**Figure 3C**), and microorganisms presenting potentially beneficial genes (**Figure 3D**) were found.

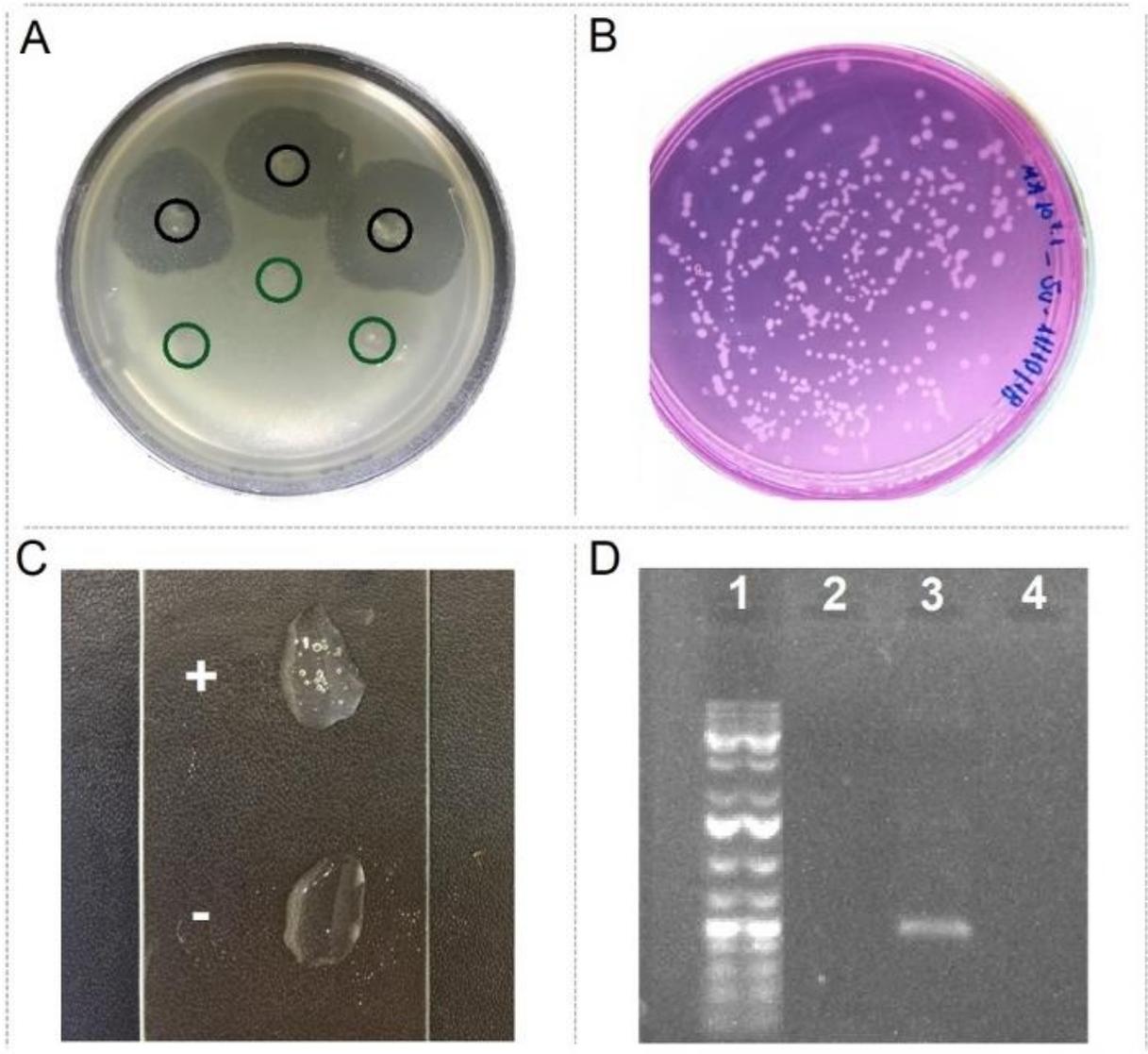
Employing the two approaches combined (i.e., bioremediation and BMC inoculation), it was possible to protect corals from oil exposure impacts. For this, an oil bioremediator pBMC consortium, isolated from the coral *Mussismilia harttii*, was inoculated on coral nubbins exposed to 1% oil in triplicates<sup>21</sup>. The treatments exposed to oil presented a progressive decrease in Fv/Fm from the fourth day onwards, reaching values close to zero by the tenth day. Variable fluorescence/maximum fluorescence (Fv/Fm) provided a measure of maximal photosystem II (PSII) photochemical efficiency of the zooxanthellae, representing an indirect measurement of coral health. On the other hand, coral nubbins present in the aquariums inoculated with the consortium showed a better-preserved photochemical ability (**Figure 4**).



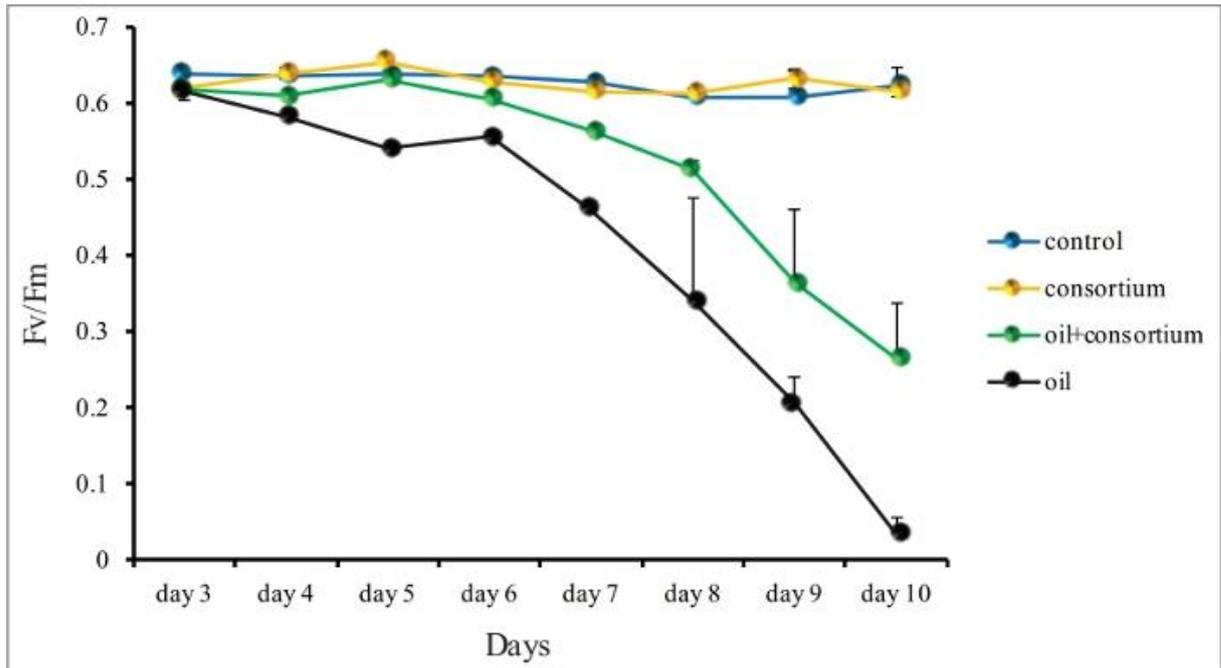
**Figure 1: Summary of the main steps of a bioremediator-pBMC consortium selection and assembly.** Scheme of pollutant-degrading microorganisms selection steps (in gray) and final steps used for the consortium microbial selection (DNA sequencing, growth curve, antagonism test, and consortium assembly in red).



**Figure 2: Selection of pollutant-degrading bacteria.** (A) Bacterial isolates growing on minimum media plates containing EE2 as the only carbon source. (B) Bacteria colonies growing on minimum media plates containing oWSF as the only carbon source. (C) Bacteria colonies growing on minimum media plates containing oWIF as the only carbon source.



**Figure 3: Detection of pBMC characteristics.** (A) Spots in triplicates of strain presenting antagonistic activity against the coral pathogen *Vibrio coralliilyticus* (in black) and a control strain (in green). (B) Strains growing on media containing urea as the only carbon source. (C) Strain producing catalase (+) and a bad catalase producer strain (-). (D) Example of PCR detection of the *nirK* gene (lane 1 = 1kb ladder; lane 2 = blank DNA extraction negative control; lane 3 = *nirK* detection; lane 4 = PCR reactions without template DNA).



**Figure 4: Fv/Fm measurements of *M. hartii* nubbins dark-adapted at 5 PM, using a diving-PAM chlorophyll fluorometer.** Fv/Fm measurements of the treatments control consortium, oil, and oil with consortium were performed in triplicates every day for 10 days. Standard deviation is shown. Features of the graph were modified with permission from previous results<sup>21</sup>, available at <https://www.nature.com/articles/srep18268> under a Creative Commons Attribution 4.0. Full terms at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

MOA	Microorganism	Detection technique	References
Climate regulation; sulfur cycling; antimicrobial compounds; increase antioxidant protection of cells.	<i>Aspergillus sydowii</i>	PCR for dddP gene	81
	<i>Pseudovibrio</i> sp. P12	Culture medium with DMSP	82
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	PCR for dmdA gene	33
Biological regulation of pathogens.	Microbiome from <i>Acropora palmata</i> mucus	Clear zone of inhibition	83
	Extracts from corals	Growth inhibition assay	84
	<i>Marinobacter</i> sp.	Swarming assays	85
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Agar plate cross-streaking	86
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	Agar-diffusion method	33
	<i>Symbiodinium</i> spp.	Colorimetric method	87

Benefit to the calcification process; source of nitrogen for scleractinian corals.	Microbiome from <i>Stylophora pistillata</i> mucus	_____	88
	Microbiome from <i>Acropora alciminata</i>	Method by Bolland et al.80	89
Nitrogen cycle; increase nitrogen fixation.	Microbial community	qPCR	90
	Microbial community	PCR	91
	Microbial community	qPCR	92
	Microbial community	Adapted acetylene (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> ) reduction technique	93
	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. and <i>Halomonas taeanensis</i>	PCR	33
Nitrogen cycle; decrease of the ammonium concentration.	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	PCR	33

	<i>Microbiome from Tubastraea coccinea</i>	PCR	94
	<i>Microbiome from Xestospongia testudinaria</i>	Predictive metagenome analysis	95
Holobiont protection against reactive oxygen species (ROS).	<i>Pseudoalteromonas sp., Cobetia marina and Halomonas taeanensis</i>	Catalase test	33
	<i>Symbiodinium spp.</i>	Amplex red	96
	<i>Vibrio pelagius and Sync- chococcus sp.</i>	Horseradish peroxidase-scopoletin method	97
	<i>Vibrio fischeri</i>	Multiple methods	98

**Table 1: Detection of putative BMC characteristics, mechanism of action (MOA), reported microorganisms presenting the potential and technique used to detect the characteristic.**

**Discussion**

Bioremediation approaches have been massively explored over the past 50 years. For instance, over 200 microbes among bacteria, cyanobacteria, microalgae, and fungi in several different habitats, have been designated as able to indicate the presence and/or degrade oil hydrocarbons<sup>62,63,64</sup>. Additionally, other classes of compounds that cause impacts to the environment and to humans, such as plastic, bisphenol A, endocrine disruptors, and heavy metals, are targets for bioremediation technique development<sup>65,66,67</sup>. On the other hand, marine probiotic development has been limited to the fields that have an obvious impact on the economy, such as fish probiotics in aquaculture<sup>68,69</sup>. However, isolation and characterization of beneficial microorganisms to protect coral reefs, marine ecosystems that support fishery, tourism, and other profitable activities, are starting to be valued<sup>15</sup>. Here, a cheap, easy, and accessible protocol to select pollutant-degrading microorganisms that can also present potentially beneficial characteristics to local marine ecosystems, especially putative beneficial microorganisms to corals (pBMCs), is described.

Additionally, the method demonstrated here is highly adaptable to several compounds and diverse types of microbial sources. It is possible to target different pollutants by replacing the only carbon source added to the minimum media. For this, instead of oil or EE2, other compounds should be added at the desired concentration. This would

be the selective pressure to isolate degraders for the targeted pollutants. For instance, microorganisms capable of degrading other classes of endocrine disruptors have been already selected and tested using the same methodology<sup>70</sup>. Moreover, other marine and terrestrial organisms, such as sponges and plants<sup>71,72</sup>, as well as distinct types of environmental samples, such as soil, fuel, and rocks can be used as the degrading-microbial sources<sup>25,73,74</sup>. For instance, it was possible to detect and isolate hydrocarbon-degrading bacteria from different soil and sediment samples<sup>25,54,63,64,75</sup>. Finally, performing slight modifications in the media, microorganisms other than bacteria can be easily selected as the degrading-microbes. For instance, a microalgae strain with the ability to efficiently degrade estrogen compounds has been reported<sup>76</sup>.

Ideally, bioremediation-probiotic consortia must be assembled for each specific compound or area. Microbes that grow in a specific environment may not grow as well in new sites compared to their native conditions. Because researchers have not found a product that can be efficiently applied under all different environmental conditions, new consortia assembly should be performed for each specific situation. This would be akin to personalized medicine for environment-tailored recovery. For this reason, the creation of a central bank of microbial strains with potential probiotic characteristics and degradation capacity is a crucial step for the progress of this field. This initiative would save time and work, contributing to the assembly of new specific consortia worldwide.

Microorganisms associated with corals (i.e., microalgae, bacteria, archaea, fungi, and viruses) have a complex and intricate role in maintaining host homeostasis<sup>19</sup>.

Environmental stressors, such as pollution, can also destabilize the coral microbiome, resulting in dysbiosis, which may cause disease and mortality<sup>30</sup>. The mechanisms by which the coral microbiome may support coral health are starting to be revealed. These mechanisms are the key to understanding coral resistance and resilience to environmental stressors and, consequently, to promote reef persistence and preservation. Additionally, findings in the field will help to understand general host-microbiome interactions, which may contribute to the development of better probiotics and health-promoting strategies in other areas. It is also important to better investigate how these probiotics inoculations can interfere on the metaorganism's health during stress events. For instance, work showing that the augmentation in coral performance is due to the probiotics and not simply the coral using bacteria as a food source are still needed.

In parallel, the development of new consortia delivery approaches and the improvement of the existing ones are of great importance. Alternative methods for consortium immobilization as well as innovative approaches, such as inoculating coral food (i.e., artemia and rotifers) and using them as vectors, are promising. These delivery systems can also be modified to target other marine organisms and will be essential to the success of the marine probiotics field.

Pollution mitigation and coral reef persistence are currently two of the main topics highlighted in environmental conferences regularly. The Agenda 2030, a document published by the United Nations that describes the global goals society should reach to allow a sustainable future, dedicates specific goals for each issue. While Goal 6

highlights the importance of water quality improvement by reducing pollution, Goal 14 reinforces the relevance of conservation and sustainable use of the oceans, seas, and marine resources<sup>77</sup>. In this context, coral reef conservation depends on changes that should be achieved in the near future, including pollution mitigation. This is of great importance, because most massive coral losses occurred when other factors were added to climate events, such as local habitat destruction and contamination<sup>78,79</sup>. This paper demonstrated that it is possible to combine bioremediation and pBMC inoculation to degrade specific pollutants, while it may increase coral's resistance and resilience to deal with pollutants and other issues. The optimization of existent protocols and/or the development of innovative methods, combined or independently applied, will be crucial to determine the future of marine ecosystems.

## **Disclosures**

The authors declare no conflict of interest.

## **Acknowledgments**

This research was carried out in association with the ongoing R&D project registered as ANP 21005-4, "PROBIO-DEEP - Survey of potential impacts caused by oil and gas exploration on deep-sea marine holobionts and selection of potential bioindicators and bioremediation processes for these ecosystems" (UFRJ / Shell Brasil / ANP) – "PROBIO-DEEP - Levantamento de potenciais impactos causados pela exploração de óleo e gás em holobiontes marinhos em mar profundo e seleção de

potenciais bioindicadores e processos biorremediadores para esses ecossistemas”, sponsored by Shell Brasil under the ANP R&D levy as “Compromisso de Investimentos com Pesquisa e Desenvolvimento. The authors also thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support, and to Camila Messias, Phillipe Rosado, and Henrique Fragoso dos Santos, for the images provided.