



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E
MOLECULAR**

GILMARA HENRIQUES ARAUJO

**Caracterização bacteriológica da água do mar e diversidade de bactérias
cultiváveis associadas ao coral *Siderastrea stellata* nos recifes costeiros de
Cabo Branco, João Pessoa-PB**

**João Pessoa – PB
2013**

GILMARA HENRIQUES ARAUJO

**Caracterização bacteriológica da água do mar e diversidade de bactérias
cultiváveis associadas ao coral *Siderastrea stellata* nos recifes costeiros de
Cabo Branco, João Pessoa-PB**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Biologia Celular e
Molecular do Centro de Ciências Exatas e da
Natureza, da Universidade Federal da
Paraíba, como parte dos requisitos para
obtenção do título de **MESTRE EM
BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

Orientadora: Profa. Dra. Krystyna Gorlach Lira

Coorientadora: Profa. Dra. Cristiane Francisca da Costa

João Pessoa – PB

2013

GILMARA HENRIQUES ARAUJO

Dissertação de Mestrado avaliada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Krystyna Gorchach Lira
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular – Universidade
Federal da Paraíba
Orientadora

Prof. Dr. Roberto Sassi
Departamento de Sistemática e Ecologia – Universidade Federal da Paraíba
Examinador Externo

Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira
Departamento de Biologia Molecular - Universidade Federal da Paraíba
Examinador Interno

Prof.^a Dra. Patrícia Mirella da Silva Scardua
Departamento de Biologia Molecular - Universidade Federal da Paraíba
Suplente

Aos meus pais,

Maria Gelba Henriques Araujo e Valderio de Oliveira Araujo por serem a base em minha vida, por todo carinho e amor que me dedicam.

Ao meu namorado,

Max Mahyron Guedes Santos por sua imensa compreensão e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus (Meu Pai e Senhor) por permitir mais um avanço em minha vida profissional e a oportunidade de conhecer pessoas tão valiosas.

Aos meus pais, Maria Gelba Henriques Araujo e Valderio de Oliveira Araujo, pelo constante incentivo e por sempre lutarem para fornecer o melhor aos filhos. Amo vocês!

Ao meu namorado, Max, por toda ajuda, apoio, força durante todo o trabalho, pois sem ele não teria conseguido realizá-lo. Acima de tudo, agradeço por existir.

As minhas irmãs, Gabriela e Gearlanza, por também contribuírem com mais essa vitória.

A minha orientadora, Krystyna Lira, por seus ensinamentos, compreensão, paciência e antes de tudo por ter depositado sua confiança desde o nosso primeiro contato. A co-orientadora Cristiane Costa pela ajuda e contribuições no trabalho.

Aos meus eternos amigos do Biomicro, Laís, Daianne, Valberta, Teresa Cristina (TCris) e Itácio, por todas as contribuições, por muito companheirismo, amizade, alegrias e por que não pelas dificuldades que passamos juntos. Em especial a Laís, TCris e Itácio por seus valiosos ensinamentos.

Aos meus amigos, Guisepe Fernandes, Jordanne e Aline, pela ajuda e pelas inúmeras vezes que filtram água. Pelas conversas e risadas que me alegrava.

A secretária da Pós-Graduação, Ludmilla, por ser sempre muito prestativa e atenciosa.

A técnica do Biomicro, Dona Alda, pelo auxílio.

A minha turma de mestrado, especialmente Isabela Arruda, por seus conselhos e conversas.

E finalmente a todos que de alguma forma contribuíram e acreditaram no meu ideal.

RESUMO

Bactérias desempenham um papel fundamental na saúde dos corais. Devido à confirmação de que elas podem ser patogênicas ou mutualistas, aumentou o interesse no estudo de microrganismos associados aos corais. Nos recifes costeiros do Estado da Paraíba observam-se casos de alteração de pigmentação no escleractíneo *Siderastrea stellata*, que provavelmente ocorre no processo de branqueamento de corais. Neste trabalho objetivou-se analisar a quantidade e diversidade de bactérias cultiváveis associadas ao coral *S. stellata* sadio e com coloração alterada (roxo) dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa – PB, bem como os parâmetros físico-químicos e microbiológicos de água do mar da área estudada durante um ano. Entre as variáveis ambientais (temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido, turbidez) da água dos recifes e da praia de Cabo Branco apenas a turbidez apresentou maiores diferenças entre os locais estudados. Na base das análises de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e enterococos foi constatado que a água dos locais analisados se enquadra dentro dos parâmetros para águas salinas de classe I (CONAMA 274/00). Em geral, os valores da densidade de bactérias totais e *Vibrio* spp. foram significativamente maiores em água do mar nos meses de dezembro, janeiro e fevereiro. Na base de dados de sequenciamento parcial do gene RNAr 16S foi constatado que as bactérias isoladas de *S. stellata* sadia e roxa pertenceram às classes de Alfa-proteobactéria e Gama-proteobactéria, sendo que a variedade dos gêneros de bactérias foi bastante distinta entre os isolados das duas colônias. Os isolados da colônia roxa apresentaram um alto percentual de *Vibrio* spp., que são bactérias geralmente relacionadas com as doenças de corais.

Palavras-chave: *Siderastrea stellata*, corais, diversidade bacteriana, gene RNAr 16S.

ABSTRACT

Bacteria play a fundamental role in the health of corals. The interest in the study of microorganisms associated with corals has increased since the confirmation that they can be pathogenic or mutualistic. In the coastal reefs of the State of Paraíba the cases of the pigmentation changes of scleractinian *Siderastrea stellata*, that probably occurs in the process of coral bleaching, are observed. The aim of this work was to analyze the density and diversity of culturable bacteria associated with healthy and with pattern pigmentation altered (pink) colonies of coral *S. stellata* of coral reefs of Cabo Branco, João Pessoa - PB, as well as the physico-chemical and microbiological parameters of seawater in the study area over one year. Among the environmental variables (temperature, salinity, pH, dissolved oxygen, turbidity) of the reefs and beach water of Cabo Branco, only turbidity showed higher differences among the sites studied. The thermotolerant fecal coliforms, enterococci and *Escherichia coli* of seawater at the study sites were within the limits recommended for saline water class I (CONAMA 274/00). In general, the values of density of total heterotrophic bacteria and *Vibrio* spp. were significantly higher in the seawater during the months of December, January and February. According to the results of the partial sequencing of the 16S rRNA gene was found that bacteria isolated from healthy and pink *S. stellata* belonged to the classes Alpha-Proteobacteria and Gamma-Proteobacteria, and the variety of genera of bacteria were very different among the isolates from the two colonies. The high percentage of *Vibrio* spp., bacteria that are usually related to the diseases of corals, were observed among the isolates from pink colony.

Keywords: *Siderastrea stellata*, corals, diversity of bacteria, 16S rRNA gene.

Lista de Abreviaturas

μL – microlitros

μm – micrômetro

16S RNAr – Ácido ribonucléico da subunidade ribossomal menor

AESA- Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba

atm – atmosfera

BBD - Black-band disease

C + G - Citosina + Guanina

CO_2 - Gás carbônico

Conama – Conselho Nacional do Meio Ambiente

DNA - Ácido desoxirribonucleico

dNTP– desoxirribonucleotídeos trifosfatados

EC – Caldo *Escherichia coli*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

M – molar

Mm – milimolar

MUG - 4-Metilumberiferil b-D-Glicuronida

NaCl – Cloreto de sódio

NMP - Número Mais Provável

OD – Oxigênio dissolvido

pb – pares de base

PBSS - Pink blue spot syndrome

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

ppt – partes por trilhão

PSE - Petrifilm Staph Express

RNA - Ácido ribonucleico

RNAase – ribonuclease

rpm – rotação por minuto

TCBS – Meio Tiosulfato, citrato, bÍlis e sacarose

UFC - Unidade Formadora de Colónias

UNT- Unidades Nefelométricas de Turbidez

WBD - White-band disease

WPD - White plague disease

Lista de Figuras

Figura 1. Colônias de corais <i>S. stellata</i> sadia e roxa nos recifes de corais de Cabo Branco. ...	16
Figura 2. Árvore Filogenética Universal.....	22
Figura 3. Vista geral dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB.....	26
Figura 4. Recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB.....	26
Figura 5. Vista da Praia de Cabo Branco, João Pessoa – PB.	27
Figura 6. Praia de Cabo Branco, João Pessoa – PB.	27
Figura 7. Vista aérea do litoral de João Pessoa - PB (Praia de Cabo Branco, Praia de Seixas, Praia de Penha). O Rio Cabelo deságua no limite das praias de Seixas e da Penha..	28
Figura 8. Índice pluviométrico mensal no período de outubro/2011 a setembro/2012..	33
Figura 9. Temperatura superficial da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.	34
Figura 10. Os valores de pH da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.	35
Figura 11. Salinidade da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.	36
Figura 12. Oxigênio dissolvido da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.	37
Figura 13. Turbidez da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.	38
Figura 14. Produtos da amplificação do gene RNAr 16S de algumas linhagens isoladas do tecido de <i>S. stellata</i>	47
Figura 15. Percentual dos gêneros das linhagens de bactérias isoladas da colônia sadia do coral <i>S. stellata</i>	50
Figura 16. Percentual dos gêneros das linhagens de bactérias isoladas da colônia roxa do coral <i>S. stellata</i>	51
Figura 17. Árvore filogenética de bactérias isoladas da colônia sadia de <i>S. stellata</i> dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB, baseada nas sequências do gene RNAr 16S.	52
Figura 18. Árvore filogenética de bactérias isoladas da colônia roxa de <i>S. stellata</i> dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB, baseada nas sequências do gene RNAr 16S....	53

Lista de Tabelas

Tabela 1. Média, mediana, mínima e máxima dos parâmetros físico-químicos da água dos recifes de corais do Cabo Branco-PB.	34
Tabela 2. Média, mediana, mínima e máxima dos parâmetros físico-químicos medidos na água da praia do Cabo Branco-PB.	39
Tabela 3. Densidade de coliformes totais, coliformes termotolerantes e de enterococos na água dos recifes de Cabo Branco.	41
Tabela 4. Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> e de enterococos na água dos recifes de Cabo Branco.	41
Tabela 5. Densidade de coliformes totais, coliformes termotolerantes e de enterococos na água da praia de Cabo Branco.	42
Tabela 6. Ocorrência de <i>Escherichia coli</i> e de enterococos fecais na água da praia de Cabo Branco.	43
Tabela 7. Densidade de bactérias heterotróficas totais e <i>Vibrio</i> spp. em amostras de água coletadas nos recifes e na praia de Cabo Branco.	44
Tabela 8. Densidade de bactérias totais heterotróficas e <i>Vibrio</i> spp. em tecido de <i>S. stellata</i> sadia e roxa.	46
Tabela 9. Identificação das linhagens isoladas do tecido da colônia sadia e roxa do coral <i>S. stellata</i> dos recifes de Cabo Branco, João Pessoa-PB baseada nas análises do BLAST das sequências de RNAr 16S.	48

SUMÁRIO

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Lista de Abreviaturas

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO	13
1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS AMBIENTES RECIFAIS	13
1.2 ASPECTOS GERAIS DO ESCLERACTÍNEO <i>Siderastrea stellata</i>	15
1.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS NA ÁGUA DO MAR	16
1.4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS CORAIS.....	18
1.5 DOENÇAS DOS CORAIS.....	19
1.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS.....	21
2.OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL.....	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1 ÁREA DE ESTUDO	25
3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DA ÁGUA DO MAR E DO CORAL <i>Siderastrea stellata</i>	28
3.3 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DO MAR	29
3.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS NO TECIDO DE <i>Siderastrea stellata</i> E NA ÁGUA DO MAR	29
3.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENÓTIPICA DE BACTÉRIAS DO TECIDO DE <i>Siderastrea stellata</i>	30
3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>Siderastrea stellata</i>	30
3.6.1 Extração de DNA	30
3.6.2 Amplificação do gene RNAr 16S e purificação dos produtos da PCR	31

3.6.3 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise filogenética das bactérias isoladas do tecido de <i>Siderastrea stellata</i>	31
3.7 ANÁLISE DE DADOS	32
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DO MAR.....	33
4.2 CARACTERIZAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA DO MAR.....	40
4.2.1 Coliformes e Enterococos	40
4.2.2 Bactérias heterotróficas totais e <i>Vibrio</i> spp.	43
4.3 DENSIDADE DE BACTÉRIAS NO TECIDO DE <i>Siderastrea stellata</i>	45
4.4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CORAL <i>Siderastrea stellata</i>	47
5. CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS AMBIENTES RECIFAIS

Os recifes de corais são considerados ecossistemas altamente biodiversos, sendo um rico banco genético, além de participarem da reciclagem da matéria orgânica contribuindo assim para o equilíbrio bioquímico da natureza. Os recifes são formações compostas por uma espessa camada calcária recoberta por uma camada de organismos vivos (VILLAÇA, 2009). Sua composição calcária é bastante resistente à ação das ondas funcionando como uma barreira natural, protegendo os sistemas costeiros (MUSCATINE, 1990; LEÃO, 1994). O principal grupo construtor dos corais são os escleractíneos, os quais conseguem se desenvolver graças à relação simbiótica que possuem com as zooxantelas. Zooxantelas é um termo genérico usado para as microalgas, dinoflageladas do gênero *Symbiodinium*, são capazes de viver livremente, porém são endossimbiontes de diversos organismos dos recifes de corais, a maioria dos corais construtores de recifes é dependente dessas microalgas (CORREIA, 2005; BERKELMANS; OPPEN, 2006).

São considerados ecossistemas antigos por apresentaram uma taxa de crescimento muito lenta, tanto o crescimento longitudinal como, e principalmente, o aumento da altura do coral, sendo medida em escala de tempo geológica. As taxas mais rápidas de aumento da altura da estrutura coralínea são de 9 a 15 metros em 1000 anos, isso ocorre devido às atividades erosivas, sejam elas físicas como a ação das ondas, biológicas como a mordida de um peixe, ou químicas quando algum ser vivo secreta substâncias que possam dissolver ou enfraquecer o coral, porém o entulho gerado das erosões ajuda na cimentação do recife de corais. Além disso, os corais têm um crescimento intercalado, período no qual o coral para de crescer e período que retoma o crescimento, tal fenômeno acontece quando há variações drásticas dos níveis dos mares durante eras geológicas (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001).

Geralmente os recifes se formam em regiões tropicais com uma rápida deposição de carbonato de cálcio, sendo um ecossistema cosmopolita da faixa térmica que varia de 20°C do Hemisfério Norte a 20°C do Hemisfério Sul, em profundidade de até 40 metros com salinidade alta e constante, tendo uma maior ocorrência em lugares de águas rasas, quentes e claras (THURMAN, 1997; CORREIA, 2005; VILLAÇA, 2009). As principais extensões recifais são a Indopacífica e a Atlântica; a Atlântica possui 5.900 km de extensão descontínua partindo da região das Bermudas (32°30'N) até o Rio de Janeiro (23°00'S) (CORREIA, 2005). Segundo Spalding, Ravilious e Green (2001), os recifes de corais da costa brasileira representam apenas 0,6% da totalidade dos recifes de corais da Terra.

Os ambientes recifais são considerados ecossistemas marinhos com maiores índices de biodiversidade estando entre as comunidades bentônicas mais complexas (CONNELL, 1978). Os recifes de corais são verdadeiras florestas tropicais em ambiente marinho, ricos em diversas espécies, como peixes, algas, crustáceos, moluscos além dos cnidários (MOREIRA; REUSS-STRENZEL, 2009). Porém diferentemente do que acontece na extensão Indopacífica que possui uma alta diversidade, os recifes de corais do Atlântico apresentam uma diversidade bem menor devido às extinções que ocorreram nas glaciações dos períodos Plioceno e Pleistoceno que foram mais severas no Atlântico, eliminando diversas espécies que antes eram comuns nas duas extensões. Hoje os recifes do Indopacífico e Atlântico compartilham apenas sete gêneros e cerca de um décimo das espécies de Escleractíneos (CORREIA, 2005).

Os recifes brasileiros por estarem localizados na extensão do Atlântico têm por característica uma baixa diversidade na fauna coralínea com apenas 18 espécies, mas destas, seis são espécies endêmicas: *Mussismilia braziliensis* (Verrill, 1868); *Mussismilia hipóida* (Verrill, 1868), *Mussismilia hartti* (Verrill, 1868); *Favia leptophylla* (Verrill, 1868), *Favia grávida* (Verrill, 1868) e *Siderastrea stellata* (Verrill, 1868) (LEÃO; KIKUCHI; TESTA, 2003). Recentemente Nunes, Norris e Knowlton (2011), relataram em seu trabalho que são encontradas no Brasil 23 espécies de corais construtores de recifes, das quais cinco são endêmicas (*Favia leptophylla*, *Meandrina braziliensis*, *Mussismilia braziliensis*, *Mussismilia hartti*, *Mussismilia hipóida*). Segundo os mesmos autores *S. stellata* é encontrada também no Caribe e Atlântico Oriental, contudo a sua ocorrência compartilhada entre Brasil e essas regiões ainda é debatida entre taxonomistas e biogeógrafos.

São ambientes com muita importância ambiental, mas também econômico-social. Eles oferecem ação contra erosão provocada pelo hidrodinamismo, são considerados bioindicadores da temperatura global, potencial fonte de farmacoterápicos, são áreas de ecoturismo, também são ambientes explorados pela atividade pesqueira, devido a sua grande ictiofauna. Apesar de sua importância ecológica e econômica, os corais de recifes têm sofrido ameaças a sua vitalidade e diversidade provocada principalmente pelas atividades antrópicas, como desenvolvimento urbano, escoamento superficial na zona costeira, turismo marinho, exploração descontrolada de recursos naturais, e poluição industrial (LEÃO, 1999). Dentre as diversas atividades humanas que podem afetar os recifes de corais a drenagem pode ser considerada uma das mais prejudiciais, pois ela arrasta consigo sedimentos que aumentam a turbidez dificultando a passagem da luz necessária para algumas espécies de corais, também aumenta a sedimentação que em muitos casos contribuem para o aterramento do coral (ERFTEMEIJER et al., 2012).

1.2 ASPECTOS GERAIS DO ESCLERACTÍNEO *Siderastrea stellata*

Segundo Brusca e Brusca (2007) a Ordem dos Scleractinia pertencente ao Filo Cnidaria é formada por mais de 1.300 espécies divididas em 24 famílias, conhecidos como corais verdadeiros ou pétreos devido à formação de esqueleto calcário que formam septos. A maioria dos representantes desta ordem vive em colônias e cerca da metade das espécies apresentam uma relação simbiótica com zooxantelas. Segundo Costa et al. (2004), os escleractíneos apresentam uma densa população dessas microalgas e por isso ela sugeri que as zooxantelas tenham diversos papéis importantes no desenvolvimento do coral. Um desses papéis é o de fornecimento de oxigênio; o oxigênio liberado da fotossíntese das zooxantelas é em parte utilizado na respiração do coral hospedeiro e a outra parcela na própria respiração (KÜHL et al., 1995).

A calcificação do esqueleto dos escleractíneos se dá por um mecanismo controlado pelo epitélio *calicoblast* o qual secreta uma matriz orgânica fluida e por processos extracelulares bastante organizados que proporcionam a deposição de carbonato de cálcio, porém a esqueletogênese depende também de outras variáveis como pH da água, concentração de aragonita e calcita (MARUBINI et al., 2008; CROOK et al., 2012). O sucesso das estruturas de carbonato de cálcio é em parte atribuída ao benefício que a simbiose fornece aos corais construtores de recifes (GÓMEZ-CABRERA et al., 2008), pois segundo Allemand et al. (1998), Furla et al.(1998) e Furla et al. (2000) as zooxantelas podem controlar a calcificação e o aumento da matriz orgânica provocando modificações físicas no microambiente interno dos corais.

Dentre o gênero *Siderastrea*, a espécie *S. stellata* é um coral escleractíneo amplamente distribuído no Brasil, estando presente nos corais que se estendem desde Maranhão até o Rio de Janeiro ocupando geralmente substratos horizontais de até 10m de profundidade, sendo considerada uma espécie relativamente resistente a ações de ondas, temperatura, sedimentação e variações de salinidades (LABOREL, 1970; CASTRO; PIRES, 2001; SEGAL; CASTRO, 2000). Atualmente, *S. stellata* é sugerida como uma espécie resultante da hibridização de duas outras: *S. siderea* e *S. radians* (NUNES; NORRIS; KNOWLTON, 2011).

A espécie *Siderastrea stellata* foi descrita por Verrill em 1868 e tem como característica morfológica apresentar colônias relativamente esféricas e maciças, podendo também mostrar-se com formato achatado e hemisférico ou ainda alongado, essas variações no formato sofrem influência da profundidade das águas; em águas mais rasas as colônias geralmente são pequenas (diâmetro até 10 cm) e arredondadas, enquanto em águas mais profundas os exemplares são maiores (diâmetro maior que 20 cm) (LABOREL, 1970; SANTOS, 2003; LEÃO, 1986). No recife de coral do Cabo Branco-PB são

encontradas colônias de *S. stellata* que possuem diâmetro variando de 1 a 28 cm de pigmentação amarronzada e hemisférios achatados que se ficam expostos durante as marés baixas (COSTA, 2006).

S. stellata nos recifes do Nordeste do Brasil apresenta colônias marrons (Health Coral Chart; D5, D6, pigmentação normal para *S. stellata*), bem como vários tipos de branqueamento, com diferentes tipos de alterações de padrão normal de pigmentação, apresentando manchas rosas ou brancas nas colônias marrons, bem como colônias roxas e colônias branqueadas (Figura 1) (COSTA, 2006).



Figura 1. Colônias de corais *S. stellata* sadia e roxa nos recifes de corais de Cabo Branco. Fonte: Gilmara Henriques e Krystyna Lira, 2010.

1.3 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E INDICADORES MICROBIOLÓGICOS NA ÁGUA DO MAR

Mudanças nas características químicas, físicas e biológicas no sistema aquático podem levar ao desequilíbrio da fauna e flora, diminuição dos seres vivos e até mesmo substituição por espécies mais resistentes (CARVALHO; SCHLITTLER; TORNISIELO, 2000). Por isso é necessário o monitoramento dos diversos fatores físico-químicos como, por exemplo, temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido, turbidez para que se possa verificar a intensidade dos impactos antrópicos no ecossistema dos recifes.

A temperatura é um dos principais parâmetros a ser monitorado, pois o aumento da temperatura pode contribuir para expulsão das zooxantelas, o que caracteriza o fenômeno de branqueamento que dependendo da intensidade pode provocar queda da biodiversidade de simbiontes, redução da taxa de calcificação e conseqüentemente redução do crescimento linear das colônias de corais (GLYNN, 1993; ALLEMAND et al., 1998; FURLA et al., 1998; FURLA et al., 2000; SPERLING, 2005; GÓMEZ-CABRERA et al., 2008; LIÑÁN-CABELLO et al., 2010).

O pH mede a concentração de íons de hidrogênio (H^+), mostrando o nível de acidez, alcalinidade ou neutralidade. A água dos recifes de corais é alcalina, caso venha ocorrer a diminuição do pH, esse fenômeno pode acarretar em uma diminuição da diversidade de espécies construtoras de recifes de corais, selecionando espécies mais tolerantes as mudanças de pH, como espécies de *Siderastrea* e *Porites* (SPERLING, 2005; CROOK et al., 2012).

A salinidade é um fator que também influencia na saúde dos corais. As chuvas e enchentes de plumas de rios costeiros podem provocar reduções significativas na salinidade principalmente em recifes rasos; o evento é agravado quando coincide com a maré baixa. Essa queda nos níveis de salinidade pode provocar o branqueamento das colônias de corais (KERSWELL; JONES, 2003).

Além do monitoramento físico-químico, o microbiológico também é necessário. A preocupação com a transmissão de doenças através da água do mar usada para recreação e balneabilidade levou ao desenvolvimento de normas e critérios de qualidade da água. A determinação da potencialidade da água transmitir doenças pode ser feita indiretamente por meio de micro-organismos indicadores de contaminação fecal pertencentes principalmente ao grupo dos coliformes. Ao mesmo tempo, essa preocupação nos trás informação sobre se um determinado local está ou não sofrendo descarga de contaminantes que possam afetar a biota local e o uso da água, pois a presença de coliformes fecais (também chamados de coliformes termotolerantes) na água do mar é um forte indício de que houve descarga de esgoto doméstico (KAMIZOULIS; SALIBA, 2004; SPERLING, 2005).

No Brasil a Resolução do Conama de nº 274 de 29 de novembro de 2000 define os critérios de balneabilidade da água, os quais se baseiam na quantidade de coliformes termotolerantes, *Escherichia coli* e Enterococos (BRASIL, 2000). O grupo das coliformes é caracterizado por apresentarem β -galactosidase e pela capacidade de fermentar lactose com produção de gás no período de 24 horas em temperaturas em torno de 44°- 45°C quando inoculadas em meios contendo sais biliares. Bactérias do tipo *E. coli* são caracterizadas pela presença das enzimas β -galactosidase e β -glicuronidase, fermentam lactose e manitol e produzindo ácido indol a partir do triptofano. Entre as bactérias capazes de suportar e multiplicar-se em condições adversas estão enquadrados os Enterococos, pertencente ao grupo dos estreptococos fecais, exibindo a capacidade de crescimento em pH básico (9,6), temperaturas que variam entre 10° C e 45° C (BRASIL, 2000).

1.4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AOS CORAIS

As bactérias possuem a capacidade de ocupar os mais diversos nichos ecológicos, são abundantes no solo, ar, água e no interior de outros organismos. As bactérias também são encontradas nas águas dos mares e oceanos e até mesmo associadas aos corais, os quais apresentam uma microbiota bastante biodiversa (ROHWER et al., 2002).

O interesse no estudo de microrganismos associados aos corais aumentou diante da confirmação que eles podem ser patogênicos ou mutualistas, quando utilizam os restos de alimento do coral, realizam fixação de nitrogênio, produção de vitaminas e substâncias antimicrobianas (MARHAVER; EDWARDS; ROHWER, 2008).

Existem evidências de que a microbiota dos corais possui funções na ciclagem de nutrientes e na resistência a patógenos (MOUCHKA; HEWSON; HARVELL, 2010). Como mostra Rohwer et al. (2001) em seu trabalho, no qual identificaram uma associação entre a espécie construtora de recifes de corais *Montastraea franksi* e bactérias, onde evidenciaram que as bactérias estavam relacionadas com a ciclagem de nitrogênio, sugerindo que essa relação pode ser importante para o desenvolvimento dessa espécie.

O estudo de associações entre seres vivos é bastante interessante sob o ponto de vista evolutivo, pois a evolução permitiu que esses seres seguissem caminhos semelhantes para poderem interagir entre si, como acontece com as interações bactéria-coral (MOUCHKA; HEWSON; HARVELL, 2010). Uma questão crucial para o entendimento das associações de microrganismos é se eles apresentam nichos bem definidos, redundantes ou neutros dentro de uma comunidade (FUHRMAN et al., 2006).

No caso da associação bactéria-coral, foi observado que existem bactérias vivendo no muco e na coluna de água que se encontra em contato com a superfície do coral. Esses organismos podem exercer um papel específico na biologia dos corais ou podem ser apenas oportunistas, pois muitas bactérias que estão na coluna de água podem ficar presas ao muco dos corais e serem consideradas, de forma errônea, como residente daquele organismo (ROHWER et al., 2001; RITCHIE, 2006). Além disso, o muco é uma substância rica em nutrientes tornando-o um ambiente propício para proliferação das bactérias, fazendo com que a densidade bacteriana seja maior quando comparada com a da coluna de água (BROWN; BYTHELL, 2005).

Entretanto, foi observado que algumas espécies de bactérias são hospedeiras específicas do coral, mas a estabilidade espaço-temporal dessas associações ainda vem sendo discutida (AZAM 2001; ROHWER et al., 2001; ROHWER et al., 2002; FRIAS-LOPEZ et al., 2004; BOURNE; MUNN, 2005; KLAUS et al., 2005; LONG; AZAM, 2001; HEWSON et al., 2006a, 2006b; SEKAR et al., 2006; LAMPERT et al., 2008; REIS et al., 2009).

As bactérias fornecem vantagens ao coral como a produção e secreção de substâncias antibióticas que impedem a proliferação de organismos patogênicos e, da mesma forma que acontece com as zooxantelas, mudanças no clima global podem afetar essas associações provocando a troca de comunidades mutualísticas por comunidades que possam afetar a saúde do coral (ROHWER et al., 2002; RESHEF et al., 2006; RITCHIE, 2006; ROSENBERG et al., 2007; LITTMAN et al., 2009).

Nos corais já foram encontrados diversos microrganismos associados como eucariontes heterotróficos, archaea, vírus e bactérias. Segundo Lins-de-Barros et al. (2010), os corais apresentam um alto nível de diversidade taxonômica de bactérias.

As bactérias encontradas nos corais geralmente pertencem aos táxons das Alfa-proteobactéria, Beta-proteobactéria e Gama-proteobactéria, com a maioria das bactérias fazendo parte do grupo das Gama-proteobactéria, no qual se destaca a família *Vibrionacea* (BOURNE; MUNN, 2005; ROHWER et al., 2001). Dentre as bactérias associadas aos corais diversos gêneros são conhecidos: *Azospirillum*, *Hirschia*, *Fabibacter*, *Blastochloris*, *Stella*, *Vibrio*, *Arcobacter*, *Staphylococcus*, *Paenibacillus*, *Pseudoalteromonas* (ROHWER et al., 2001; CASTRO et al., 2010; MOUCHKA; HEWSON; HARVELL, 2010).

Levantamentos mostram que tipos de bactérias específicas são encontrados em determinadas regiões, mas também espécies semelhantes de corais são habitadas por tipos semelhantes de bactérias mesmo que estes corais estejam em localização geográfica distinta (ROHWER et al., 2002; KLAUS et al., 2005; GUPPY; BYTHELL, 2006; LITTMAN et al., 2009).

1.5 DOENÇAS DOS CORAIS

Nas últimas décadas os ecossistemas de recifes de corais vêm sendo degradados em ritmo acelerado, em parte devido às doenças, das quais a gravidade e a ocorrência têm sido cada vez maiores (HARVELL et al., 1999; HUGHES et al., 2003; BAKER; GLYNN; RIEGL, 2008; HARVELL, 2004; WEIL; SMITH; GIL-AGUDELO, 2006; HARVELL et al., 2007; RIEGL, 2008).

Os corais de recifes apresentam intensidade e coloração de tecidos bem variados, sendo que a cor acastanhada é devido à presença de zooxantelas (PORTER et al., 1984). Acredita-se que a coloração dos corais pode ser causada pigmentos do próprio tecido do coral ou por pigmentos dos simbiontes que se espalham homoganeamente por todo tecido conferindo a cor ao coral (DOVE; TAKABAYASHI; HOEGH-GULDBERG, 1995; TAKABAYASHI; HOEGH-GULDBERG, 1995; VAN WOESIK, 1998; RINKEVICH; SAKAI, 2001).

A mudança de pigmentação dos corais é uma característica bastante utilizada para o monitoramento da saúde, que também sofre influência das mudanças climáticas. Isso é possível devido à correlação existente entre branqueamento e as variações climatológicas (SZMANT; GASSMAN, 1990; FAUTIN; BUDDEMEIER, 2004).

Diversos tipos de doenças vêm acometendo os recifes do mundo todo, inclusive do Brasil. Mais de 35 doenças encontradas em corais já foram descritas, mas apenas uma parte dos patógenos foi identificada, contudo já foi percebido que tanto em corais branqueados quanto em corais doentes ocorre uma mudança na comunidade microbiana na camada de muco que envolve o coral. Foi observado que geralmente o surgimento de bactérias do gênero *Vibrio*, frequentemente ocorre concomitantemente ao aumento de temperatura da água e que esses patógenos podem persistir por um longo tempo mesmo com a volta da normalidade das condições ambientais (RICHARDSON, 1998; MAO-JONES et al., 2010).

A pigmentação ou sua mudança podem estar relacionadas com incidência de doenças. Dentre as doenças agressoras dos corais que podem ser percebidas devido à mudança de coloração estão: Black-band disease (BBD), White-band disease (WBD), White plague disease (WPD) e o fenômeno Pink blue spot syndrome (PBSS).

Black-band disease (BBD) é uma das primeiras doenças descobertas, descrita pioneiramente por Antonius (1973), é ocasionada por bactérias sulfatos-redutoras e cianobactérias formando uma faixa sobre a colônia de coloração que varia do preto ao vermelho. A colônia do coral doente morre, restando apenas o esqueleto descoberto o qual é colonizado por algas e isto dificulta uma possível recuperação subsequente (RICHARDSON; KUTA, 2003; RICHARDSON, 2004; MULLER; WOESIK, 2011; FRIAS-LOPEZ et al., 2004).

White-band disease (WBD), é uma infecção bacteriana dos corais *Acropora spp.* que provoca o aparecimento de frações de esqueleto nú às vezes acompanhado de tecido desintegrado ou até necrosado. A doença se espalha pelos ramos a partir da base do coral, sendo identificada pela primeira vez por Gladfelter em 1977. (RICHARDSON, 1998; ARONSON; PRECHT, 2001; LENTZ; BLACKBURN; CURTIS, 2011).

White plague disease (WPD) foi vista pela primeira vez em recifes de corais da Flórida ocorrendo em dois surtos, o primeiro surto foi chamado White plague disease tipo I (WPD I) e o segundo chamado White plague disease tipo II (WPD II) devido à semelhança dos sintomas da doença dos surtos, mais tarde foi descoberto que ambos os surtos foram causados pela mesma bactéria patogênica, até então, pertencente a um gênero e espécie novos, da ordem Rhizobiales e da classe α -proteobactéria sendo chamada de *Aurantimonas coralícida*. A doença causada por *A. coralícida* pode levar toda colônia do coral a morte (CROQUER; PAULS; ZUBILLAGA, 2003; DENNER et al., 2003).

O fenômeno Pink Blue Spot Syndrome (PBSS) se caracteriza pelo surgimento de manchas rosa-azul no tecido de corais, principalmente dos gêneros *Acropora*, *Porites* e *Goniastrea* sendo predominante em águas mais profundas com prevalência na profundidade de 9 metros, porém a síndrome não se mostra letal (BONGIORNI; RINKEVICH, 2005). Ainda segundo Bongiorno e Rinkevich (2005), as manchas de cor rosa azuladas são mais frequentes em partes do coral injuriados ou em alguma parte do esqueleto que está exposta sem a cobertura do tecido, sugerindo que essas manchas são marcadores locais de estresse.

Os trabalhos sobre a diversidade da microbiota dos cnidários do Nordeste do Brasil são ainda escassos, sobretudo no contexto da saúde e doença desses organismos. Nos recifes costeiros do Estado da Paraíba observam-se casos de branqueamento em corais, hidróides calcários e zoantídeos, bem como as doenças que acometem zoantídeo *P. caribbaeorum* e o escleractíneo *S. stellata* (COSTA; SASSI; AMARAL, 2005; COSTA; SASSI; GORLACH-LIRA, 2008).

Além de ser acometida pelo branqueamento, a espécie *S. stellata* pode apresentar um fenômeno interessante, o qual tem por característica o aparecimento de manchas roxas no tecido do coral (COSTA, 2006; FARIAS; SASSI; COSTA, 2012). Segundo Costa (2006), durante sua pesquisa nos recifes de corais do Cabo Branco-PB, percebeu que o fenômeno era massivo devido ao grande número de colônias de *S. stellata* com coloração roxa, Costa (2006) sugere que talvez essas colônias roxas possam ter sido acometidas por alguma doença e que a evolução do fenômeno poderá resultar no branqueamento.

1.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS

As técnicas tradicionais para identificação de gêneros e espécies de bactérias utilizavam os testes morfofisiológicos e bioquímicos que se baseavam em cultivos de bactérias nos meios de culturas não-seletivos e seletivos e testes bioquímicos diferenciais, principalmente os que indicam produção de enzimas específicas para cada grupo bacteriológico (GANDRA et al., 2008).

Os testes bioquímicos podem se mostrar variáveis devido ao efeito que os fatores ambientais podem exercer sobre a expressão gênica em bactérias. Outras desvantagens dessas técnicas são o baixo poder diferencial para com microrganismos de pouca variabilidade genética podendo levar a um resultado final errôneo, sobretudo quando são utilizados poucos testes, porém a utilização de um alto número de avaliações microbiológicas acarreta em uma pesquisa de alto custeio como também demanda vários dias para obtenção dos resultados (FABER et al., 2001).

Nos últimos anos as técnicas moleculares vêm se desenvolvendo bastante e sendo cada vez mais utilizadas como uma das ferramentas fundamentais na identificação de bactérias. Testes que têm como base a análise dos ácidos nucleicos - DNA e RNA - estão sendo aplicados com sucesso por apresentarem vantagens como o tempo de resposta mais curto, maior sensibilidade e especificidade (GLYNN et al., 2006). As técnicas moleculares se desenvolveram de maneira mais acelerada com o advento da técnica conhecida como PCR – *Polimerase Chain Reaction* (MALORNY et al., 2003). Tais técnicas também permitiram maior conhecimento de novas espécies bacterianas que vivem em ambientes pouco explorados (VELÁZQUEZ et al., 2001).

As análises filogenéticas são realizadas por meio do estudo das sequências do gene de RNAr 16S, uma vez que esse gene possui uma alta taxa de fragmentos conservados evolutivamente utilizados para identificar espécies, traçar filogenia, mesmo em organismo com uma distância evolutiva considerável, além de ser uma molécula onipresente (WOESE, 2000). E foi com base no RNAr 16S (procariontes) e 18S (eucariontes) que foi criada a árvore filogenética universal (Figura 2), que resume a história evolutiva dos seres vivos (WOESE, 2000).

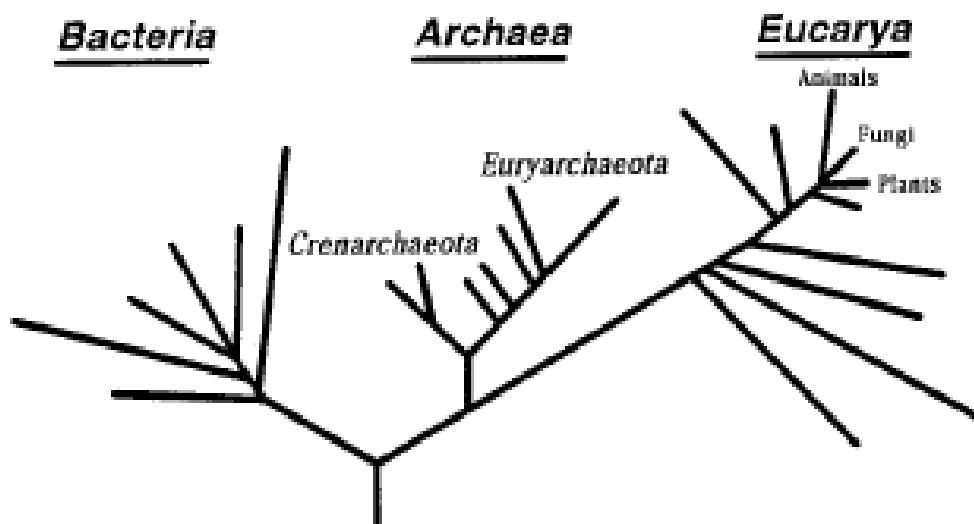


Figura 2. Árvore Filogenética Universal. Fonte: Woese, 2000.

A princípio o domínio Bacteria foi subdividido em 12 filos por Woese em 1987 (WOESE, 1987), posteriormente Hugenholtz e colaboradores em 1998 dividiram o domínio em 36 filos, dos quais, algo em torno de 12 desses 36 filos, não possuíam representantes em culturas (HUGENHOLTZ; GOEBEL; PACE, 1998). Rappé e Giovannoni (2003)

distinguiram 52 filios de bactérias, dos quais 26 filios são constituídos por sequências gênicas clonadas do ambiente.

Os filios bacterianos mais representativos são as Proteobactéria, Firmicutes, Actinobactérias, Bacteroides. Dentre esses filios, o qual apresenta um maior número de representantes que se associam com espécies de corais construtores de recifes são as Proteobactérias, sendo o maior filo na atualidade, onde está reunida a maiorias das bactérias gram-negativas e heterotróficas já identificadas (BOURNE; MUNN, 2005; ROHWER et al., 2001; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Firmicutes são representados por bactérias gram-positivas, formadoras de endósporos (*Bacillus*) além de possuir gêneros com grande importância na microbiologia médica como os *Enterococcus* e *Streptococcus* e na microbiologia industrial com os *Lactobacillus*. O filo Actinobactéria é formado por bactérias gram-positivas, várias espécies de bactérias pleomórficas e com alto índice de G + C, enquanto que os micro-organismos pertencentes as Bacteroidetes são anaeróbios com espécies que habitam o trato intestinal humano e outras que vivem no solo (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os aspectos físico-químicos e microbiológicos da água dos recifes de corais e da praia de Cabo Branco, João Pessoa – PB, e avaliar a densidade e diversidade de bactérias associadas às colônias sadias e roxas do coral *Siderastrea stellata* dos recifes de Cabo Branco.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a água dos recifes e da praia de Cabo Branco com relação aos parâmetros físico-químicos e indicadores microbiológicos de qualidade de água;
- Quantificar as bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. na água dos recifes e da praia de Cabo Branco e no tecido de *S. stellata*;
- Isolar e identificar as bactérias associadas ao coral *S. stellata*;
- Analisar e comparar a diversidade de bactérias cultiváveis no tecido de *S. stellata* sadia e roxa.

3. MATERIAS E METÓDOS

3.1 ÁREA DE ESTUDO

A área de estudo situa-se na Praia de Cabo Branco localizada no litoral sul da cidade de João Pessoa do Estado da Paraíba, Brasil. A pesquisa foi realizada em dois locais: nos recifes costeiros (7°08'50"S; 34°47'51"W) e na praia (7°08'55"S; 34°47'46"W) de Cabo Branco (Figuras 3, 4, 5 e 6).

A praia de Cabo Branco possui aproximadamente 10 km de extensão e caracteriza-se por apresentar os terraços de abrasão compostos por aglomerados de rochas arenito-ferruginosas margeados por uma falésia marcada por uma intensa erosão marinha.

Os recifes de Cabo Branco são formados por grande quantidade de rochas. A erosão das ondas sobre as rochas as fragmentam recobrando uma vasta área da praia e se estendendo também por centenas de metros mar adentro. As rochas juntamente com as estruturas calcárias dos seres vivos formam a base do recife, bem como delimitam as poças de maré que favorecem a formação de habitats bastante complexos além de beneficiar a alta biodiversidade (SASSI, 1987; ROSA; ROSA; ROCHA, 1997; GONDIM et al. 2008). As poças de maré ficam expostas durante a maré baixa e a intensa ação das ondas faz com que o concerne do substrato se mostra irregular (Figura 4).

Nos recifes de Cabo Branco é possível encontrar protozoários loricados do microplâncton, esponjas, tunicados, uma considerável diversidade de peixes recifais, além de do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* e corais construtores de recifes como *F. gravida*, *Porites astreoides* e *S. stellata*, esse último em maior quantidade (COSTA, 2006; SASSI; MELO, 1989; ROSA; ROSA; ROCHA, 1997; GAMA, 2003).

No limite entre a praia de Seixas e a praia da Penha deságua o Rio Cabelo (7°08'53" e 7°11'02" de latitude sul e 34°47'26" e 34°50'33" de longitude oeste), o qual, segundo Farias et al. (2008), sofre poluição e contaminação por esgotos domésticos e industriais, resíduos sólidos da exploração da atividade mineradora e agropecuária (Figura 7). O Rio Cabelo tem um alto potencial de contaminação dos recursos hídricos superficiais e subterrâneos (Farias et al., 2008).



Figura 3. Vista geral dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB. Fonte: Gilmara Henriques, 2012.



Figura 4. Recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB. Fonte: Gilmara Henriques Araujo, 2012.



Figura 5. Vista da Praia de Cabo Branco, João Pessoa – PB. Fonte: Gilmara Henriques Araujo, 2012.



Figura 6. Praia de Cabo Branco, João Pessoa – PB. Locais de pesquisa: (*) praia de Cabo Branco; (**) recifes de cabo Branco. Fonte: www.skyscrapercity.com

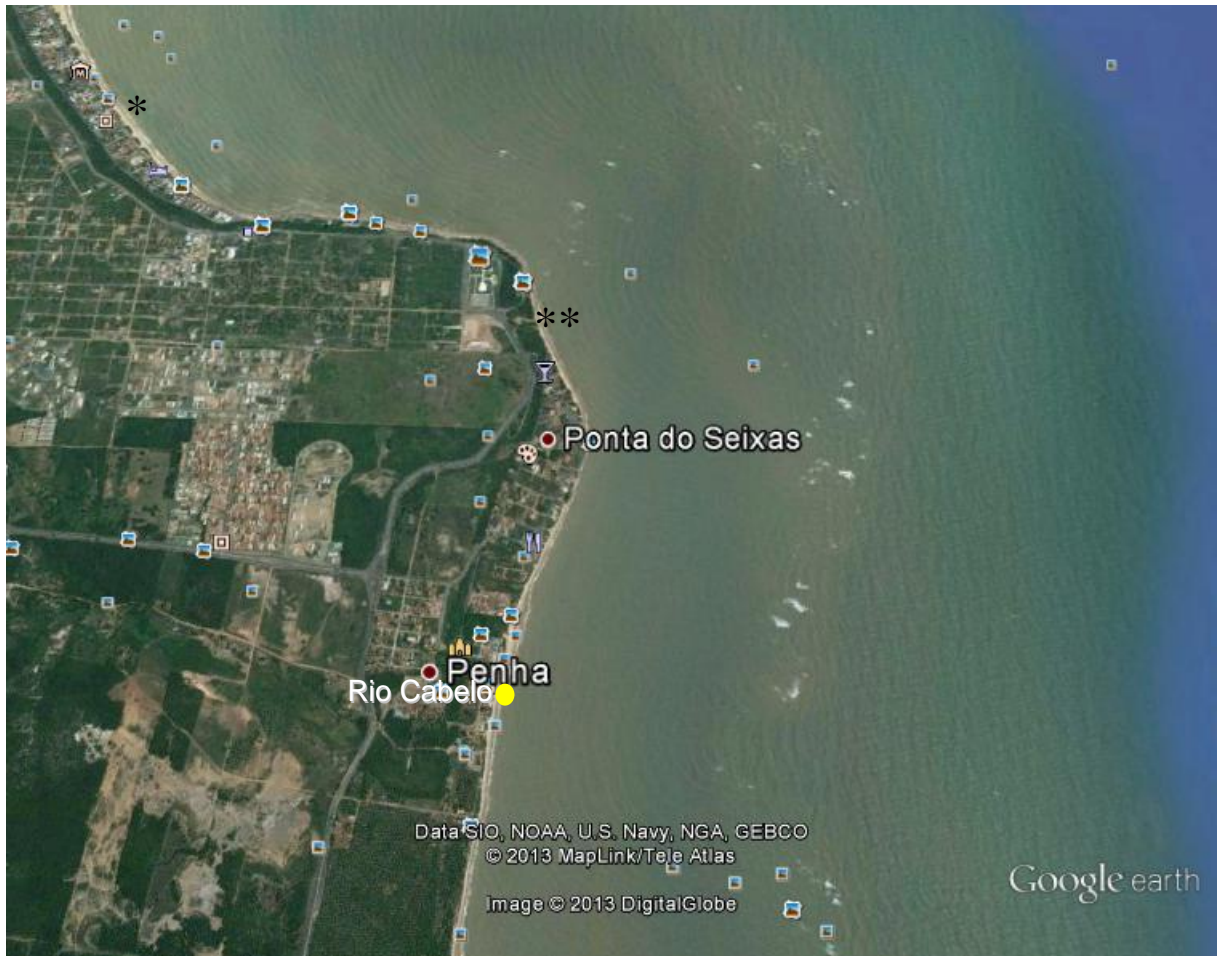


Figura 7. Vista aérea do litoral de João Pessoa - PB (Praia de Cabo Branco, Praia de Seixas, Praia de Penha). O Rio Cabelo deságua no limite das praias de Seixas e da Penha. Locais de pesquisa: (*) praia de Cabo Branco; (**) recifes de Cabo Branco. Fonte: Google Earth (acesso em 10. abril. 2013).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS DA ÁGUA DO MAR E DO CORAL *Siderastrea stellata*.

A coleta de água do mar foi realizada na margem dos recifes de Cabo Branco e na praia de Cabo Branco mensalmente no período entre outubro de 2011 a setembro de 2012. As amostras foram coletadas em garrafas de 500 ml esterilizadas, levada para o laboratório e mantida em 4°C até a realização das análises microbiológicas (no máximo 24 horas).

As colônias de *S. stellata* com diâmetro inferior a 12cm foram coletadas nos recifes de Cabo Branco. Para análise de densidade de bactérias foram coletadas colônias de *S. stellata* sadia nos meses: de junho e novembro de 2011, janeiro, junho, julho, agosto e setembro de 2012. No mês de junho/2011 além de ter sido coletada uma colônia sadia também foi coletada uma roxa, das quais foram isoladas as bactérias para a análise da diversidade.

3.3 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS E MICROBIOLÓGICOS DA ÁGUA DO MAR

Foram efetuadas medidas dos seguintes parâmetros físico-químicos na água dos recifes de Cabo Branco e da praia de Cabo Branco: temperatura, salinidade, pH, oxigênio dissolvido por meio de uma sonda mutiparamétrica HANNA® modelo HI 9828. A turbidez das amostras de água foi medida usando o Turbidímetro Plus Microprocessado da ALFAKIT.

Os seguintes indicadores microbiológicos foram utilizados para avaliar a qualidade de água do mar dos recifes de Cabo Branco e da praia de Cabo Branco: coliformes totais e termotolerantes, presença de *Escherichia coli* e estreptococos fecais. As enumerações de coliformes totais e termotolerantes em amostras de água foram realizadas através da técnica dos tubos múltiplos ou Número Mais Provável (NMP), de acordo com APHA (1995), utilizando-se os seguintes meios de cultura: o caldo Lauril Sulfato de Sódio (presuntivo para coliformes totais); o caldo Lactose Bile 2% Verde Brilhante (confirmativo para coliformes totais e presuntivo para coliformes termotolerantes) e o caldo *Escherichia coli* (EC) (confirmação para coliformes termotolerantes). Determinou-se presença de *E. coli* utilizando o meio fluorogênico Ágar MUG Nutriente (Himedia).

A quantificação de estreptococos fecais (enterococos) foi feita através da técnica NMP utilizando o meio caldo dextrose azida (APHA, 1995). A confirmação da presença de enterococos foi determinada no meio Enterococos Seletivo de Pfizer (PSE, Himedia) seguindo a metodologia de Eaton; Clesceri; Greenberg (1995).

A precipitação mensal do período estudado foi obtida junto ao site da AESA-PB (www.aesa.pb.gov.br) segundo os dados coletados pelo posto João Pessoa/DFAARA.

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE BACTÉRIAS NO TECIDO DE *Siderastrea stellata* E NA ÁGUA DO MAR

Foram realizadas contagens de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. nas amostras de água coletadas nos recifes de Cabo Branco e da praia de Cabo Branco, bem como no tecido de *S. stellata*.

O tecido das colônias de corais foi extraído por meio de jatos de compressão de ar utilizando água filtrada e autoclavada no aparelho “waterpik”, de acordo com Dustan (1979).

As diluições decimais seriais de amostras da água do mar e do tecido extraído foram realizados adicionando 10mL da amostra a 90mL de água do mar filtrada e autoclavada (diluições de 10^{-1} a 10^{-4}).

Após a preparação das diluições foi retirado 1mL de cada diluição e colocado em placas de Petri estéreis, onde foi adicionado de 15 a 20mL dos respectivos meios de cultura. As contagens de bactérias heterotróficas totais foram feitas nas placas com meio Agar marinho (Himedia) incubadas a 30°C por 5 dias. As contagens de *Vibrio* spp. foram realizadas nas placas com o meio TCBS (Himedia) incubadas a 35°C por 24 horas.

As contagens de bactérias foram expressas em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por mL de água ou cm² da colônia do coral.

3.5 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS DO TECIDO DE *Siderastrea stellata*.

As cepas bacterianas isoladas das colônias de *S. stellata* sadia e roxa foram cultivadas no meio Agar marinho (Himedia) e escolhidas aleatoriamente para serem purificadas. As linhagens puras foram estocadas em Agar marinho semissólido e em água destilada estéril.

A caracterização das linhagens foi feita por meio da coloração de Gram seguindo Gerhardt et al. (1994). As lâminas coradas foram visualizadas no microscópio Leica ICC50 e as bactérias foram classificadas com Gram-positivas ou Gram-negativas, bem como foi analisada a forma de células bacterianas.

3.6 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *Siderastrea stellata*.

3.6.1 Extração de DNA

Para obter o DNA genômico total, as cepas foram cultivadas em Caldo marinho por a 30°C. O volume da cultura foi centrifugado a 6.000 rpm durante 10 minutos. As células bacterianas foram ressuspensas em tampão TE, pH 8,0(Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M) e congeladas a -20°C.

O DNA genômico total das linhagens de bactérias foi extraído seguindo o método de Cheng e Jiang (2006) com algumas modificações. Para extração foi utilizada uma centrífuga refrigerada da marca eppendorf, modelo 5490R. A extração iniciou-se com adição de 400µL de tampão STE, pH 8,0 (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M; NaCl 5M) e centrifugação das células bacterianas por 5 minutos a 13.000g, em seguida o pelet foi ressuspenso em 200µL de tampão TE, pH 8,0 e em seguida foram adicionados 200µL de pérolas de vidro (Ø425-600µm) e 200µL de fenol saturado (pH 8,0). Os microtubos foram colocados no vórtex por

90 segundos e centrifugados por 5 minutos a 13.000g em 4°C. Posteriormente foi removido 160µL da fase superior da amostra e adicionou-se 40µL de TE e 100µL de clorofórmio. Após centrifugação de amostras (5 min., 13.000g, 4°C) removeu-se 160µL da fase superior e adicionou 40µL de TE e 5µL de RNAase (10mg/mL). Após a incubação da amostra a 37°C por 10 minutos em banho-maria acrescentou-se 100µL de clorofórmio/álcool isoamil (24:1), misturou e colocou-se para centrifugar a 13.000g por 5 minutos a 4°C. O volume de 150µL da fase superior contendo DNA foi colocado em um microtubo e congelado a -20°C.

A concentração e pureza do DNA extraído foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

3.6.2 Amplificação do gene RNAr 16S e purificação dos produtos de PCR

As sequências RNAr 16S foram amplificadas no termociclador (Primus, EUA) utilizando 2µL do primer universal 26F (5'- GAGTTTGATCMTGGCTCAG) e 2µL do 1492R (5' -ACGGCTACCTTGTTACGACTT- 3') com a concentração de 50pmol/µL, 13µL tampão de PCR (Ludwig Biotech), 2µL de dNTP a 10Mm (Ludwig Biotech), 0,5µL de Taq Polimerase a 5U/µL (Ludwig Biotech), 4µL de DNA extraído com concentração aproximada de 50ng/µL. Amplificação do gene RNAr 16S foi realizada nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial a 94°C; 25 ciclos: 94°C por um minuto, 57°C por dois minutos e 72°C por dois minutos; extensão final a 72°C por 10 minutos

Foi realizada a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% com GelRed™ (Biotium) sob uma voltagem de 100 volts. O gel foi observado e fotografado no transluminador de UV para verificar a presença da banda de 1500 pb correspondente ao gene de RNAr 16S.

Em seguida a banda do produto da PCR foi recortada do gel e purificada utilizando o kit de purificação da AxyPrep™ DNA Gel Extraction (AxiGen Biosciences, EUA) conforme recomendações do fabricante. A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando um NanoDrop, modelo ND-1000 Uv/Vis.

3.6.3 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise filogenética das bactérias isoladas do tecido de *Siderastrea stellata*.

O sequenciamento das amostras foi realizado na empresa ACTGene Análises Moleculares Ltda. (Centro de Biotecnologia, UFRGS, Porto Alegre, RS) utilizando o sequenciador automático *ABI-PRISM 3100 Genetic Analyzer* armado com capilares de 50 cm e polímero POP6 (Applied Biosystems). Os DNA-moldes (30 a 45 ng) foram marcados utilizando-se 3,2 pmol do *primer* 26F (5'- GAG TTT GAT CMT GGC TCA G - 3') e 3 µL do reagente *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100* (Applied Biosystems) em um volume final de 10 µL. As reações de marcação foram realizadas em termociclador

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems) com uma etapa de desnaturação inicial a 96°C por 3 min seguida de 25 ciclos de 96°C por 10 seg, 55°C por 5 seg e 60°C por 4 min. Uma vez marcadas, as amostras foram purificadas pela precipitação com isopropanol a 75% e lavagem com etanol a 60%. Os produtos precipitados foram diluídos em 10 µL de formamida Hi-Fi (Applied Biosystems), desnaturados a 95°C por 5 min, resfriados em gelo por 5 min e eletroinjetados no sequenciador automático. Os dados de sequenciamento foram coletados utilizando-se o programa *Data Collection* v 1.0.1 (Applied Biosystems) com os parâmetros *Dye Set* "Z"; *Mobility File* "DT3100POP6{BDv3}v1.mob"; *BioLIMS Project* "3100_Project1"; *Run Module 1* "StdSeq50_POP6_50cm_cfv_100"; e *Analysis Module 1* "BC-3100SR_Seq_FASTA.saz".

As sequências de gene rRNA 16S das cepas isoladas do tecido de *Siderastrea stellata* foram comparadas com as sequências depositadas no banco de sequencias do National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando-se BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool), disponível no site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Foram analisadas as similaridades das sequências obtidas com as sequências presentes no banco de dados e as sequências que apresentaram similaridade $\geq 97\%$ foram consideradas. O alinhamento múltiplo das sequências e a construção das duas árvores filogenéticas foram realizados através do programa MEGA versão 5.05 (TAMURA et al., 2011).

As sequências iguais foram agrupadas em 13 filotipos da colônia sadia e 11 da colônia roxa. As sequências representativas de cada filotipo foram utilizadas para construção das árvores filogenéticas e também foram depositadas no banco de dados de sequências do NCBI (códigos de acesso: KF784847 - KF784870).

3.7 ANÁLISE DE DADOS

Calcularam-se as médias, medianas e os desvios-padrão das variáveis (densidade de bactérias, parâmetros físico-químicos) utilizando o programa Statistica 7.0., com 5% de nível de significância. Para analisar os dados da densidade de bactérias totais e *Vibrio* spp. foi utilizada análise de variância (*ANOVA one-way*) e para detectar possíveis diferenças entre os meses de coleta das amostras, foi utilizado o teste de Tukey ($p \leq 0,05$). Foi estimado o coeficiente de correlação de Pearson para avaliar a relação entre os parâmetros físico-químicos e a densidade de grupos de bactérias analisadas (bactérias heterotróficas totais, *Vibrio* spp., coliformes totais e termotolerantes, estreptococos fecais), considerando o nível de significância de 5%.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 MONITORAMENTO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DA ÁGUA DO MAR

Água dos recifes de Cabo Branco

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, salinidade, oxigênio dissolvido e turbidez) foram realizados na água dos recifes de corais de Cabo Branco e na água da praia do Cabo Branco. De acordo com a Resolução 357/05 do Conama água dos locais analisados se enquadra na classe I, pois em ambos locais a água é destinada a recreação primária e a proteção das comunidades aquáticas (BRASIL, 2005).

Os corais construtores de recifes são bastante sensíveis e influenciáveis por fatores químicos, físicos e biológicos; temperatura, salinidade e a incidência de luz influenciam fortemente na distribuição dos recifes de corais (HOEGH-GULDBERG, 1999). Os fatores abióticos não só influenciam na distribuição, como também na fisiologia dos organismos, pois a intensidade e o tempo de variação de algum desses fatores pode deixar os corais mais vulneráveis ao surgimento de doenças.

Os valores da precipitação pluviométrica no período de estudo foram maiores nos meses de maio/12 (216 mm), junho/12 (540 mm) e julho/12 (290 mm), e os menores índices ocorreram nos meses de outubro/11, dezembro/11 e setembro/12 (Figura 8). Estação chuvosa foi representada por três meses com valores de precipitação maior que 200 mm e a estação seca por os meses com índice pluviométrico abaixo de 200 mm. A quantidade de precipitação pode acarretar na diminuição da salinidade da água do mar provocar estresse hipo-osmótico nos corais (KERSWELL; JONES, 2003).

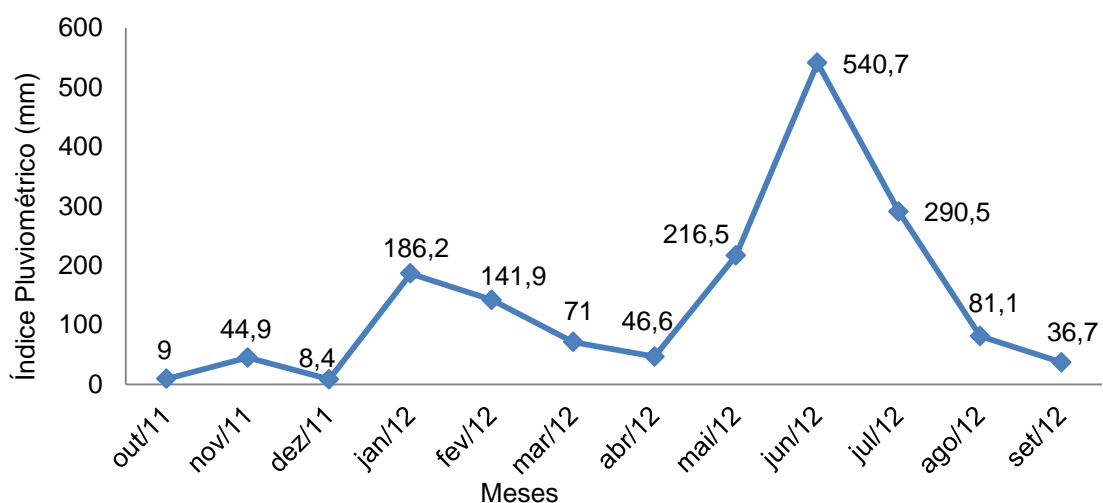


Figura 8. Índice pluviométrico mensal no período de outubro/2011 a setembro/2012. Fonte: AESA, dados referente ao Posto Pluviométrico João Pessoa/DFAARA (acesso em 01. março. 2013).

A temperatura média da água dos recifes de Cabo Branco no período analisado foi de 28,6°C, sendo que a maior temperatura registrada foi no mês de outubro de 2011, atingido 29,8°C, (Tabela 1 e Figura 9).

Tabela 1. Média, mediana, mínima e máxima dos parâmetros físico-químicos da água dos recifes de corais do Cabo Branco-PB.

Parâmetro	Média	Desvio padrão	Mediana	Mín – Máx
Temperatura (°C)	28,6	1,1	28,7	26,3 - 29,8
pH	9,2	0,6	9,1	7,9 - 10,2
Salinidade	33,8	1,3	33,8	33,9 - 35,0
Oxigênio dissolvido OD (mg/L)	6,6	2,9	5,9	3,1 – 12,5
Turbidez (UNT)	10,6	14,9	3,3	0,0 – 47,7

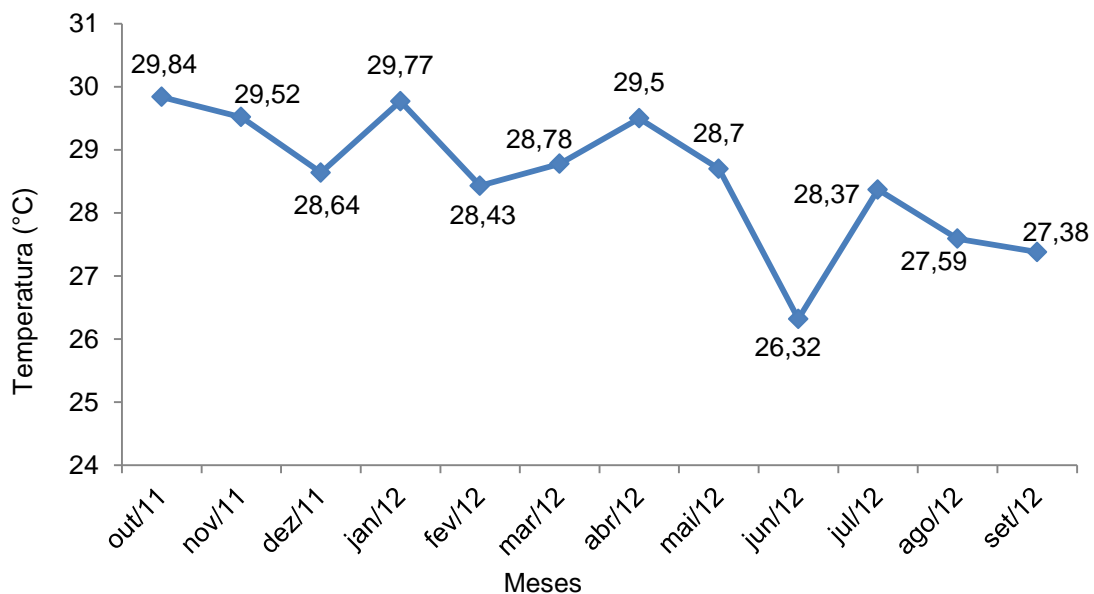


Figura 9. Temperatura superficial da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

Dentre os parâmetros físicos, a temperatura é um fator que as espécies de corais são extremamente sensíveis. A elevação de um grau Celsius em relação à média de temperatura máxima de verão pode ser considerada como limite para o surgimento de branqueamento (GLYNN, 1993; HOEGH-GULDBERG, 1999). Pesquisas realizadas nos recifes de corais costeiros de Cabo Branco no estado da Paraíba (COSTA et al., 2004), e

nas praias de Gaibu e de Tamandaré, no estado de Pernambuco (COSTA; AMARAL, 2000), evidenciaram que quando a temperatura atingia valores entre 29 e 30°C, as colônias de corais de *S. stellata* branquearam, mas quando a temperatura ficava entre 26 e 28°C as colônias retomavam sua coloração original.

A temperatura poderá, de maneira indireta, modificar as comunidades bacterianas associadas ao coral, pois ela altera a produção bacteriana de antibióticos e, portanto modifica as interações entre as bactérias (RYPIEN; WARD; AZAM, 2010). Porém, colônias que conseguem sobreviver ao branqueamento e ao aquecimento das águas superficiais oceânicas poderão provavelmente aumentar sua resistência em relação aos efeitos pós-branqueamento a exemplos das doenças infecciosas (LEÃO; KIKUCHI; OLIVEIRA, 2008).

Os valores de pH da água do recifes de Cabo Branco-PB apresentaram um caráter alcalino, variando de 7,99 a 10,24 durante o período de estudo, com uma média anual de 9,2 (Figura 10 e Tabela 1).

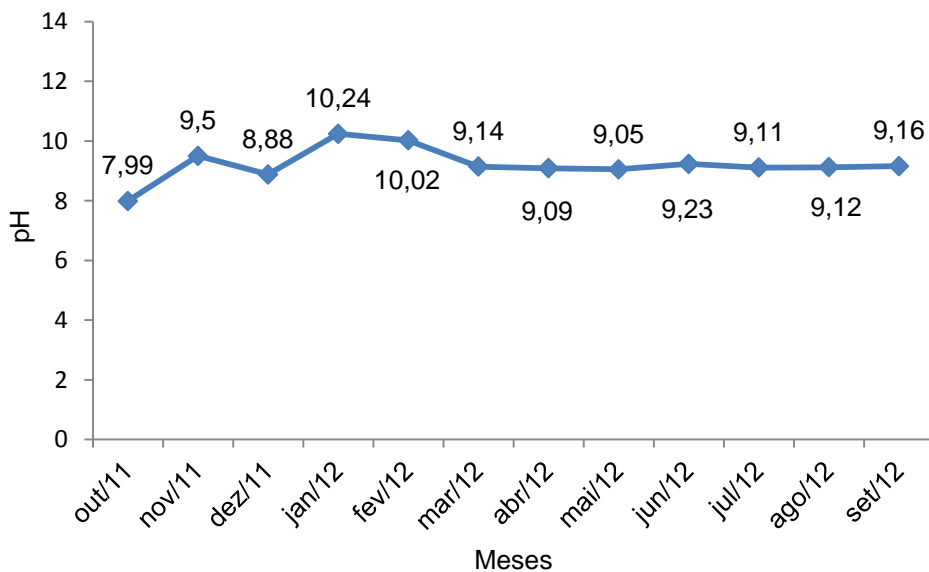


Figura 10. Os valores de pH da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

Segundo Zirino et al. (1986) o pH das águas oceânicas está em torno de 8,23 a 25°C, sob a pressão de 1 atm e salinidade entre 34-36 ppt, isso na ausência de processos biológicos. A Resolução 357/05 do Conama estabelece que em águas salinas da classe I o pH deve ser em torno de 8,5 sem mudança maior do que 0,2 unidades (BRASIL, 2005).

A acidificação da água diminui o estado de saturação da calcita e da aragonita, enquanto que o pH alcalino não prejudica os processo de calcificação dos esqueletos (esqueletogênese), assim não retarda o crescimento dos escleractíneos, caso contrário

acarretaria grande impacto ambiental, já que os escleractíneos são extremamente importantes para formação dos recifes de coral (FINE; TCHERNOV 2007; ANTHONY et al., 2008; MARUBINI et al. 2008; DONEY et al. 2009).

Em um estudo realizado por Makkaveev (2009) no norte do Mar Cáspio foram encontrados valores de pH superiores a 9. Por ser uma área protegida, descartou-se como causa desse aumento a poluição antrópica, levando a concluir que o fator responsável pelo elevado pH seria a intensa atividade fotossintética. Os recifes de corais também são ambientes com alta atividade fotossintética devido a um rico plâncton fotossintetizante, fato que pode contribuir para os elevados valores de pH nas águas dos recifes de corais de Cabo Branco.

A salinidade de água dos recifes de Cabo Branco apresentou uma média anual de 33,73 (Tabela 1). Todas as medições de salinidade realizadas na água dos recifes apresentaram valores superiores a 30, como exposto na Figura 11.

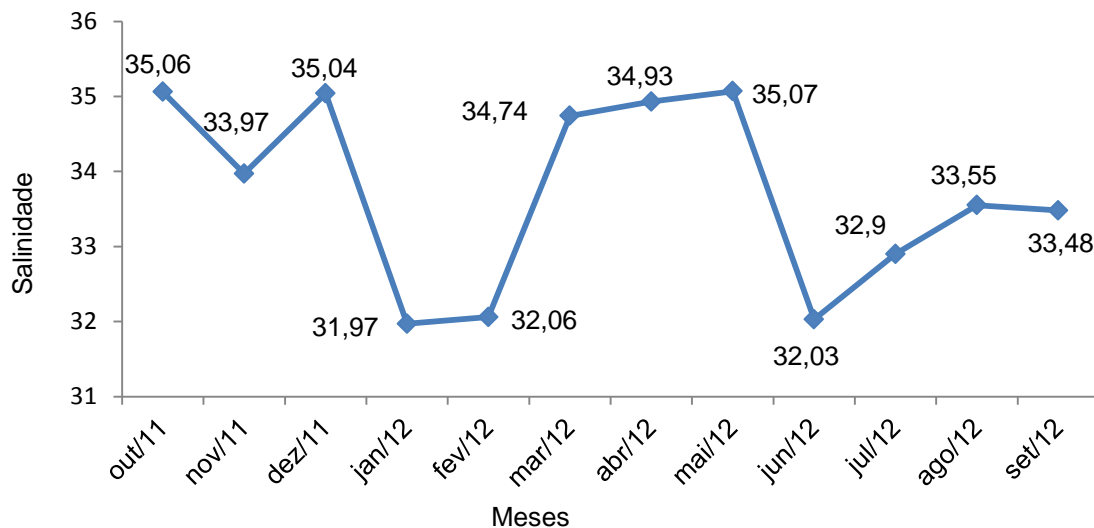


Figura 11. Salinidade da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

A manutenção do nível de salinidade é importante, pois segundo Coles e Jokiel (1978), caso venha ter uma elevação na temperatura, por um curto prazo, o coral resistirá se o nível ideal de salinidade for mantido sem sofrer quedas.

Xiubao et al. (2009), evidenciou que a espécie de coral *Galaxea fasciculares*, pertencente à ordem Scleractinia mostrou-se adaptado aos efeitos de baixa salinidade combinado com temperatura elevada, isso devido a complexos mecanismos de adaptação, os quais permitem que certas espécies resistam a fatores de estresses combinados.

Em um estudo realizado com o escleractíneo *Stylophora pistillata* coletado da Grande Barreira de Coral da Austrália, foi mostrado que a baixa salinidade pode por si só provocar alguns sintomas antes atribuídos às anomalias da temperatura, pois os efeitos osmóticos ocasionados pela diminuição da salinidade podem reduzir a eficiência da fotossíntese das zooxantelas levando ao branqueamento (KERSWELL; JONES, 2003).

O valor médio de oxigênio dissolvido na água dos recifes de Cabo Branco foi de 6,6 mg/L, com os valores máximo e mínimo de 12,54 mg/L no mês de fevereiro/2012 e 3,10 mg/L em setembro/2012, respectivamente (Figura 12 e Tabela 1). Segundo a Resolução 357/05 do Conama, a concentração de OD em qualquer amostra de água salgada destinada a proteção das comunidades aquáticas não deve ser inferior a 6mg/L de oxigênio (BRASIL, 2005). Dentre dos valores de OD obtidos neste trabalho 50% foram acima do limite estabelecido pela resolução (Figura 12).

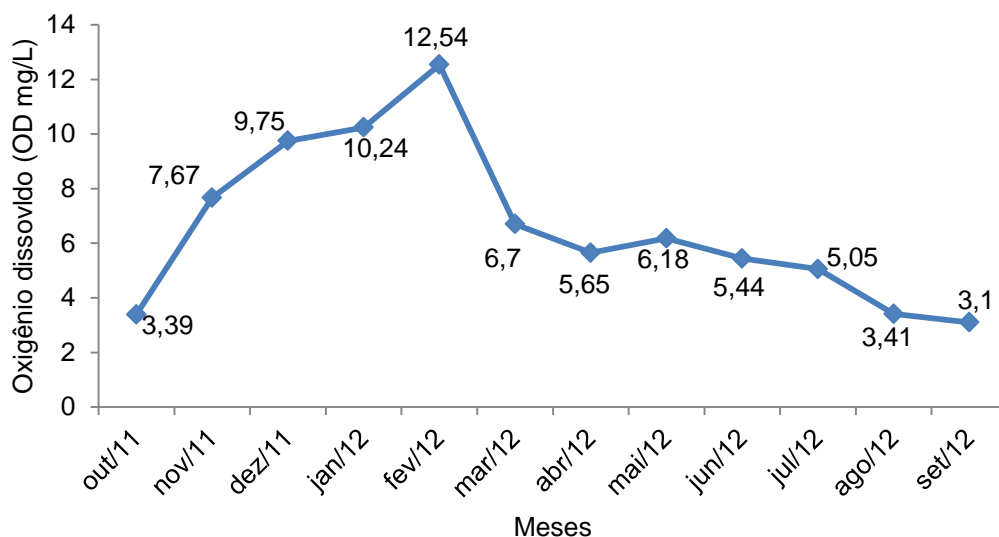


Figura 12. Oxigênio dissolvido da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

O agente oxidante primordial em águas naturais é o oxigênio dissolvido (OD) que provem da atmosfera e da fotossíntese, porém o seu consumo é causado pela respiração, perdas para atmosfera e oxidação da matéria orgânica (BAIRD, 2002), sendo um elemento indispensável para manutenção da vida aquática.

Conforme Fiorucci e Benedetti Filho (2005), a temperatura bem como a salinidade influenciam na capacidade da água dissolver oxigênio; a solubilidade do oxigênio na água diminui com o aumento da temperatura e com o aumento da salinidade.

No período de estudo o mês de janeiro/2012 foi o qual apresentou a maior temperatura (29,84°C), um dos valores mais altos da salinidade (35,06) e mais baixos da concentração de OD (3,39 mg/L) (Tabela 1).

A turbidez é causada devido às partículas que se encontram em suspensão na coluna de água, nessas partículas também estão inclusos os microrganismos e partículas no estado coloidal. Com a medição da turbidez podemos calcular o nível de interferência que o feixe de luz sofre ao passar pela água (SPERLING, 2005).

A turbidez da água dos recifes de Cabo Branco apresentou grande variação, com os valores de 0 a 47,78 UNT (Figura 13 e Tabela 1).

Abrahamas e Kattenfeld (1997) afirmam que grande a turbidez da água sofre influência dos sedimentos em suspensão, do nível de proliferação das algas e da ação dos ventos sobre o material em suspensão.

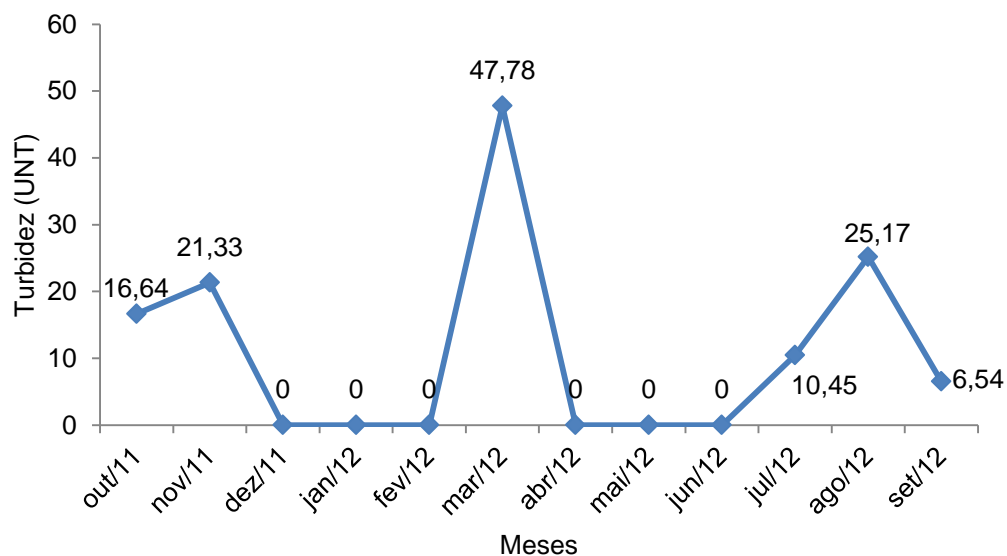


Figura 13. Turbidez da água dos recifes de corais de Cabo Branco no período de outubro de 2011 a setembro de 2012.

A disponibilidade de luz para os corais depende da profundidade, marés, turbidez e padrão de irradiação na superfície da água (KLEYPAS, 1996; MUMBY et al., 2001; van DUIN et al., 2001; ANTHONY; CONNOLLY, 2004; BROWNE; SMITHERS; PERRY, 2012). Caso nível de luz que incide sobre a superfície da água diminua, a energia disponível para os corais também diminui, já que estes dependem dos simbiontes fotossintetizantes que necessitam de uma quantidade mínima de luz para realizar processos fisiológicos.

Anthony e Fabricius (2000) concluíram em seu estudo com duas espécies de corais escleractíneos simbiontes: *Goniastrea retiformis* e *Porites cylindrica*, que diferentes espécies têm respostas diferentes em relação à diminuição do nível de luz e o aumento da turvação, o coral *G. retiformis* possui uma maior capacidade de fotoaclimação devido à

compensação heterotrófica, ou seja, em ambientes com menos luz e mais turvo, essa espécie consegue usar as partículas em suspensão como fonte de alimento e assim completar o déficit na fotossíntese, já a espécie *P. cylindrica* não possui a mesma plasticidade e consequentemente sofre redução de crescimento.

Água da praia de Cabo Branco

O monitoramento dos parâmetros físico-químicos realizados na praia do Cabo Branco tiveram de modo geral médias próximas aos encontrados nos recifes de corais, as mais divergentes foram as médias de oxigênio dissolvido e de turbidez.

Tabela 2. Média, mediana, mínima e máxima dos parâmetros físico-químicos medidos na água da praia do Cabo Branco-PB.

	Média	Desvio padrão	Mediana	Mín - Máx
Temperatura (°C)	29,3	1,1	29,7	27,4 – 30,9
pH	9,0	0,4	9,0	8,5 – 9,7
Salinidade	33,5	1,1	33,5	31,5 – 35,0
Oxigênio dissolvido OD (mg/L)	5,7	2,6	5,6	2,3 – 11,2
Turbidez (UNT)	152,0	92,1	121,3	44,8 – 353,6

A temperatura média na praia de Cabo Branco foi de 29,3°C, não tendo uma diferença considerável quando comparada com a temperatura média dos recifes que foi de 28,6°C (Tabelas 1 e 2).

Os valores médios de pH da água da praia e dos recifes foram semelhantes, 9,0 e 9,2, respectivamente. A salinidade de água nos dois locais analisados também não apresentou diferenças (Tabelas 1 e 2).

Nas medições de oxigênio dissolvido, a água da praia sempre apresentou a concentração de oxigênio dissolvido menor do que a água dos recifes de corais (Figura 12 e Anexo A). Na metade dos meses a concentração de OD foi superior a 6,0 mg/L, estando dentro das normas da Resolução 357/05 do Conama para águas salinas da classe I (BRASIL, 2005).

A turbidez foi o parâmetro que apresentou maior disparidade quando comparadas as medições da água dos recifes com a água da praia. Ao longo da pesquisa a turbidez foi bem maior na água da praia de Cabo Branco do que na água dos recifes, sendo que os valores médios foram de 152 e de 10,65 UNT nos dois locais, respectivamente (Figura 13, Anexo A e Tabelas 1 e 2). O aumento da turbidez da água na praia de Cabo Branco ocorreu

provavelmente devido à maior quantidade do material ressuspenso na água resultante do desgaste da falésia de Cabo Branco, bem como proveniente do sedimento.

4.2 CARACTERIZAÇÃO BACTERIOLÓGICA DA ÁGUA DO MAR

4.2.1 Coliformes e Enterococos

Segundo o critério estabelecido pela resolução do CONAMA 274/00, as praias são classificadas quanto à balneabilidade, nas categorias própria e imprópria, de acordo com a densidade de bactérias fecais (BRASIL, 2000). Entre as águas consideradas próprias há uma subdivisão de categoria em: excelente (presença de 250 de coliformes termotolerantes ou 200 do tipo *E. coli* ou 25 enterococos presentes em 100 mL de água); muito boa (500 coliformes termotolerantes ou 400 *E. coli* ou 50 Enterococos); e por último a categoria satisfatória (1.000 de coliformes termotolerantes ou 800 de *E. coli* ou 100 de Enterococos presentes em 1000 mL de água). Porém para as águas serem consideradas impróprias os valores das densidades bacteriológicas de coliformes devem apresentar-se superiores a 2.500 coliformes termotolerantes ou 2.000 *E. coli* ou 400 Enterococos em 100 mL de água.

De acordo com as análises realizadas, as águas coletadas nos recifes de Cabo Branco podem ser consideradas próprias para balneabilidade, pois apresentaram valores bem inferiores a 2500 coliformes termotolerantes em 100 mL de água e inferiores a 400 enterococos em 100ml de água (Tabela 3). Os meses de março e agosto apresentaram a maior quantidade de coliformes termotolerantes, ambos com 43 NMP/100mL, e o mês de fevereiro a maior quantidade de enterococos, 75 NMP/100mL (Tabela 3). Apesar de presuntivamente ter sido encontrada a presença de enterococos em todos os meses coletados em apenas dois (fevereiro/12 e junho/12) foram confirmada sua presença (Tabelas 3 e 4).

Com relação à presença de *E. coli* na água do recife de Cabo Branco, dentre as doze amostras coletadas cinco foram positivas (Tabela 4). Os resultados obtidos indicam que a presença de coliformes fecais na água dos recifes de corais do Cabo Branco está em níveis baixos caracterizando assim uma água de baixa contaminação fecal não chegando a prejudicar a salubridade do ambiente (Tabelas 3 e 4).

Ao correlacionar as contagens de coliformes termotolerantes nas amostras de água dos recifes de Cabo Branco com os parâmetros físico-químicos analisados, foi evidenciada uma forte correlação positiva com a turbidez de água ($r > 0,7$, $p < 0,05$).

Tabela 3. Densidade de coliformes totais, coliformes termotolerantes e de enterococos na água dos recifes de Cabo Branco.

Mês	Coliformes (NMP/100mL)		Enterococos (NMP/100mL)
	Totais	Termotolerantes	
Outubro/2011	< 3	<3	<30
Novembro/ 2011	< 3	<3	<30
Dezembro/2011	< 3	<3	<30
Janeiro/ 2012	< 3	<3	<30
Fevereiro/ 2012	4.300	15	75
Março/ 2012	43	43	<3
Abril / 2012	3,6	<3	<3
Mai/ 2012	15	9,2	<3
Junho/ 2012	3,6	<3	43
Julho/ 2012	9,2	<3	<3
Agosto/ 2012	93	43	<3
Setembro/2012	15	9,2	<3

Tabela 4. Ocorrência de *Escherichia coli* e de enterococos na água dos recifes de Cabo Branco.

Mês	<i>E. coli</i>	Enterococos
Outubro/ 2011	-	-
Novembro/ 2011	-	-
Dezembro/2011	-	-
Janeiro/ 2012	-	-
Fevereiro/ 2012	+ (1 mL) ^a	+ (1 mL)
Março/ 2012	+ (1 mL)	-
Abril / 2012	-	-
Mai/ 2012	+ (10 mL)	-
Junho/ 2012	-	+ (1 mL)
Julho/ 2012	-	-
Agosto/ 2012	+ (1 mL)	-
Setembro/2012	+ (10 mL)	-

+/- = presença/ausência

^a= inóculo direto

De acordo com as análises realizadas, a água da praia de Cabo Branco apenas no mês de março apresentou níveis de indicadores microbiológicos superiores ao nível recomendado pela legislação brasileira. Com relação à densidade de coliformes

termotolerantes nenhuma amostra de água apresentou o valor maior do que a 2500 coliformes termotolerantes em cada 100 mL de água, porém a densidade de enterococos fecais ultrapassou o limite de 400 enterococos por 100 mL, chegando a atingir 1.100 enterococos por 100 ml no mês de março, classificando a água imprópria para o banho neste período (Tabela 5). O maior número de coliformes termotolerantes na água da praia de Cabo Branco foi observado no mês de março, semelhante à água dos recifes, sendo que a quantidade de coliformes da água da praia foi cerca de 6 vezes maior que observada nos recifes de corais, 43 NMP/100 mL e 240 NMP/100 mL respectivamente (Tabela 3 e 5).

Assim como ocorreu com a água dos recifes, todos os meses apresentaram presuntivamente enterococos, contudo a presença foi confirmada em cinco meses: fevereiro, março, junho, agosto e setembro de 2012 (Tabelas 5 e 6).

Quanto à presença de *E. coli* na água da praia do Cabo Branco foi observado que nove amostras foram positivas (Tabela 6). As amostras de água coletadas nos meses de fevereiro, março, junho, agosto e setembro de 2012 apresentaram os dois indicadores da contaminação fecal simultaneamente, *E. coli* e enterococos (Tabela 6).

A turbidez foi a variável ambiental que mostrou forte correlação positiva com a densidade de coliformes termotolerantes e enterococos ($r > 0,7$, $p < 0,05$) da água da praia de Cabo Branco.

Tabela 5. Densidade de coliformes totais, coliformes termotolerantes e de enterococos na água da praia de Cabo Branco.

Mês	Coliformes (NMP/100 mL)		Enterococos (NMP/100 mL)
	Totais	Termotolerantes	
Outubro/2011	23	<3	<30
Novembro/ 2011	23	23	<30
Dezembro/2011	<3	<3	<30
Janeiro/ 2012	43	43	<30
Fevereiro/ 2012	2300	150	15
Março/ 2012	1100	240	1100
Abril / 2012	9,2	9,2	<3
Maió/ 2012	43	43	<3
Junho/ 2012	240	9,2	93
Julho/ 2012	240	<3	<3
Agosto/ 2012	460	15	9,2
Setembro/2012	43	43	3,6

Tabela 6. Ocorrência de *Escherichia coli* e de enterococos na água da praia de Cabo Branco.

Mês	<i>E. coli</i>	Enterococos
Outubro/ 2011	-	-
Novembro/ 2011	+ (10 mL) ^a	-
Dezembro/2011	-	-
Janeiro/ 2012	+ (10 mL)	-
Fevereiro/ 2012	+ (10 mL)	+ (1 mL)
Março/ 2012	+ (1 mL)	+ (10 ⁻¹ mL)
Abril / 2012	+ (10 mL)	-
Maió/ 2012	+ (1 mL)	-
Junho/ 2012	+ (10 mL)	+ (1 mL)
Julho/ 2012	-	-
Agosto/ 2012	+ (10 mL)	+ (10 mL)
Setembro/2012	+ (10 mL)	+ (10 mL)

+/- = presença/ausência

^a= inóculo direto

Os resultados mostram que a água da praia do Cabo Branco apresentou o grau de contaminação fecal maior do que os recifes de Cabo Branco, onde a presença de *E. coli* e enterococos simultaneamente, foi registrada apenas em fevereiro de 2012 (Tabela 4).

Estes dados evidenciam que água do Rio Cabelo não apresentou ser um fator decisivo na contaminação fecal do ambiente marinho analisado, uma vez que os recifes que estão localizados em distância próxima da deságua do Rio e apresentaram menor contaminação fecal que a água da praia distante aproximadamente de 10 km dos recifes. Ainda sim que de forma geral os locais analisados tenham sido considerados próprios para a balneabilidade, foram encontrados contaminantes fecais mostrando que, principalmente a praia tenha outras fontes de contaminação.

4.2.2 Bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp.

Os valores da densidade de bactérias totais nas amostras de água dos recifes de Cabo Branco variaram de $2,33 \times 10^2$ a $5,36 \times 10^4$ UFC/mL (Tabela 7). As contagens de *Vibrio* spp. apresentaram uma variação maior ao longo do período de estudo ($10,00 - 1,14 \times 10^4$ UFC/mL) (Tabela 7).

Os valores da densidade de bactérias heterotróficas totais e de *Vibrio* spp. nas amostras de água dos recifes de Cabo Branco foram significativamente maiores nos meses de janeiro e fevereiro de 2012 ($p < 0,05$), sendo que as contagens de *Vibrio* spp. foram

significativamente maiores também em dezembro de 2011. Não foi evidenciada diferença significativa entre os períodos seco e chuvoso (teste de Tukey, $p > 0,05$) nas contagens de bactérias totais e *Vibrio* spp. na água dos recifes de Cabo Branco.

As amostras de água coletadas na praia de Cabo Branco apresentaram as contagens de bactérias totais na faixa de $3,00 \times 10^2$ UFC/mL a $1,23 \times 10^5$ UFC/mL, e de *Vibrio* spp. de 15,00 a $5,37 \times 10^3$ UFC/mL (Tabela 7). Densidade de bactérias heterotróficas totais e de *Vibrio* spp. nas amostras da água da praia de Cabo Branco foi significativamente maior nos meses de dezembro de 2011, janeiro e fevereiro de 2012 ($p < 0,05$). As bactérias totais apresentaram contagens significativamente maiores também em março e maio de 2012. Foi constatada diferença significativa entre os períodos seco e chuvoso (teste de Tukey, $p > 0,05$) apenas para as contagens de *Vibrio* spp. na água da praia de Cabo Branco, apresentando valores maiores no período seco.

Tabela 7. Densidade de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. em amostras de água coletadas dos recifes e da praia de Cabo Branco.

Mês	Estação	Recifes		Praia	
		Bactérias heterotróficas totais (UFC/mL)	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/mL)	Bactérias heterotróficas totais (UFC/mL)	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/mL)
Outubro/2011	Seca	$1,20 \times 10^3$	$1,33 \times 10$	$3,00 \times 10^2$	$1,50 \times 10$
Novembro/2011	Seca	$6,03 \times 10^3$	$1,13 \times 10^2$	$2,13 \times 10^3$	$1,66 \times 10^2$
Dezembro/2011	Seca	$2,30 \times 10^3$	$2,56 \times 10^2$	$1,23 \times 10^5$	$4,26 \times 10^3$
Janeiro/2012	Seca	$5,36 \times 10^4$	$1,14 \times 10^4$	$3,30 \times 10^4$	$5,37 \times 10^3$
Fevereiro/2012	Seca	$2,86 \times 10^4$	$1,35 \times 10^3$	$2,57 \times 10^4$	$2,75 \times 10^3$
Março/2012	Seca	$3,33 \times 10^3$	$1,76 \times 10^2$	$6,06 \times 10^4$	$1,35 \times 10^3$
Abril/2012	Seca	$2,33 \times 10^2$	$4,00 \times 10$	$8,33 \times 10^3$	$1,16 \times 10^2$
Mai/2012	Chuvosa	$3,66 \times 10^3$	$1,5 \times 10^2$	$2,73 \times 10^4$	$3,7 \times 10^2$
Junho/2012	Chuvosa	$1,53 \times 10^3$	$3,66 \times 10$	$4,16 \times 10^3$	$8,33 \times 10$
Julho/2012	Chuvosa	$1,36 \times 10^3$	$2,8 \times 10^2$	$3,93 \times 10^3$	N.D.
Agosto/2012	Seca	$5,56 \times 10^3$	1×10	$8,66 \times 10^3$	$5,5 \times 10$
Setembro/2012	Seca	$1,60 \times 10^4$	N.D.	$1,00 \times 10^4$	$5,26 \times 10^2$

N.D. – Não Determinado

Os meses de dezembro, janeiro e fevereiro representam o período da maior atividade turística na região e aumento do número de banhistas nas praias, bem como a estação com baixo índice de chuvas e temperaturas mais altas. Todos esses fatores podem contribuir para o aumento significativo de densidade de bactérias totais e de *Vibrio* spp. na

água do mar observado nos meses de verão no presente estudo. Resultados semelhantes foram encontrados em uma pesquisa realizada na água do mar Mar Piccolo de Taranto, onde foi observada uma alta densidade de bactérias totais heterotróficas principalmente durante o verão (CAVALLO et al., 1999). Em outra pesquisa na zona costeira do Mar Adriático as maiores densidade de *Vibrio* spp. ocorreram durante os meses mais quentes assim como ocorreu com a água da praia de Cabo Branco (MONTANARI et al., 1999).

Quando correlacionado os parâmetros físico-químicos com a densidade de bactérias heterotróficas totais e com *Vibrio* spp., ambos da água dos recifes de Cabo Branco, o pH e oxigênio dissolvido foram os únicos dos parâmetros que mostraram forte correlação positiva com a densidade de bactérias heterotróficas totais ($r > 0,7$, $p < 0,05$). Já na correlação das variáveis ambientais e microbiológicas da água da praia de Cabo Branco, o pH mostrou forte correlação positiva com a densidade de *Vibrio* spp. ($r > 0,7$, $p < 0,05$).

4.3 DENSIDADE DE BACTÉRIAS NO TECIDO DE *Siderastrea stellata*.

Nos anos 2005 e 2007-2008 foram observadas mudanças sazonais na pigmentação das colônias de *S. stellata* durante eventos de branqueamento nos recifes costeiros de Cabo Branco e outros locais do Nordeste do Brasil, os quais se caracterizaram pelo surgimento de colônias pálidas, as quais se tornavam pálidas-roxas e, em seguida, roxas, permanecendo desta forma geralmente durante os meses da estação chuvosa (Sassi et al., 2013).

Entretanto, monitoramento da saúde de colônias de *S. stellata* nos recifes do Cabo Branco-PB durante o período de setembro/2011 a maio/2012 realizado por Farias, Sassi e Costa (2012) mostrou que não houve o aparecimento de colônias roxas no período estudado.

No presente trabalho as colônias sadias (pigmentação marrom) de *S. stellata* foram coletadas e analisadas durante seis meses e as colônias roxas foram observadas apenas no mês de junho de 2011, sendo assim a colônia roxa foi analisada apenas neste mês (Tabela 8).

Os corais produzem um muco bastante nutritivo ao redor de seu tecido, tornando esse ambiente propício para o crescimento de microrganismos e permitindo uma maior colonização por bactérias (BROWN; BYTHELL, 2005). As contagens de bactérias heterotróficas totais do tecido das colônias sadias foram bastante altas, variando de $2,27 \times 10^4$ UFC/cm² a $6,88 \times 10^6$ UFC/cm². Enquanto que a densidade de *Vibrio* spp. oscilou entre $7,28 \times 10^1$ UFC/cm² e $2,7 \times 10^4$ UFC/cm², sendo que no mês de agosto não foram detectadas bactérias desse gênero (Tabela 8).

O tecido extraído da colônia roxa de *S. stellata* apresentou um maior número de bactérias totais e principalmente de *Vibrio* spp. em relação à colônia sadia coletada no mesmo período (Tabela 8). Segundo vários autores as bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio*, quando presentes no tecido do coral podem causar ou estar associadas à prevalência de diversas doenças, além de serem capazes de diminuir as propriedades benéficas das zooxantelas durante o branqueamento (KUSHMARO et al., 2001; ROSENBERG; BEN-HAIM, 2002; CERVINO et al., 2004; GIL-AGUDELO; SMITH; WEIL, 2006; RITCHIE, 2006; SUSSMAN et al., 2008).

Tabela 8. Densidade de bactérias totais heterotróficas e *Vibrio* spp. no tecido de *S. stellata* sadia e roxa.

Mês	Estação	<i>Siderastrea stellata</i>			
		SADIA		ROXA (UFC/cm ²)	
		Bactérias heterotróficas totais (UFC/cm ²)	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/cm ²)	Bactérias heterotróficas totais (UFC/cm ²)	<i>Vibrio</i> spp. (UFC/cm ²)
Junho/2011	Chuvosa	3,79x10 ⁴	3,46x10 ²	2,61x10 ⁵	8,58x10 ⁴
Novembro/2011	Seca	3,01x10 ⁶	2,70x10 ⁴	-	-
Janeiro/2012	Seca	3,92x10 ⁴	7,28x10 ¹	-	-
Junho/2012	Chuvosa	2,13x10 ⁵	7,83x10 ²	-	-
Julho/2012	Chuvosa	6,88x10 ⁶	8,96x10 ²	-	-
Agosto/2012	Seca	2,27x10 ⁴	N.D.	-	-
Setembro/2012	Seca	3,12x10 ⁵	5,00x10 ³	-	-

N.D. – Não Determinado

Em uma pesquisa realizada com os corais *Pachyseris speciosa*, espécies de *Acropora* (*A. cytherea*, *A. hyacinthus* e *A. clathrata*) e em *Montipora aequituberculata* observou-se que a densidade de bactérias cultiváveis associadas aos corais foi significativamente maior nas colônias afetadas pela White Syndrome do que nas colônias sadias; a densidade de bactérias nas colônias doentes foi 20 vezes maior em relação as sadias (SUSSMAN et al., 2008). As contagens de *Vibrio* spp. no meio seletivo ágar TCBS foram expressivamente maiores para as colônias doentes sugerindo assim uma possível relação entre a densidade de *Vibrio* spp. e a doença White Syndrome dos corais (SUSSMAN et al., 2008).

4.4 DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO CORAL *Siderastrea stellata*.

Foram isoladas 80 linhagens de bactérias do tecido de *S. stellata*, sendo que 40 linhagens foram obtidas da colônia sadia e 40 da colônia com pigmentação roxa. Todas as linhagens analisadas foram Gram-negativas.

Os DNAs genômicos extraídos das 80 linhagens bacterianas apresentaram um rendimento que variou de 62 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ a 3096 $\eta\text{g}/\mu\text{l}$ e com alto grau de pureza ($\text{OD}_{260-280}$ entre 1,6 – 2,0). Com a amplificação do gene RNAr 16S obteve-se fragmentos de 1500 pb de tamanho, porém apenas 71 amostras (38 amostras isolados do coral sadio e 33 do coral roxo) apresentaram a amplificação satisfatória e foram submetidas ao sequenciamento (Figura 14).

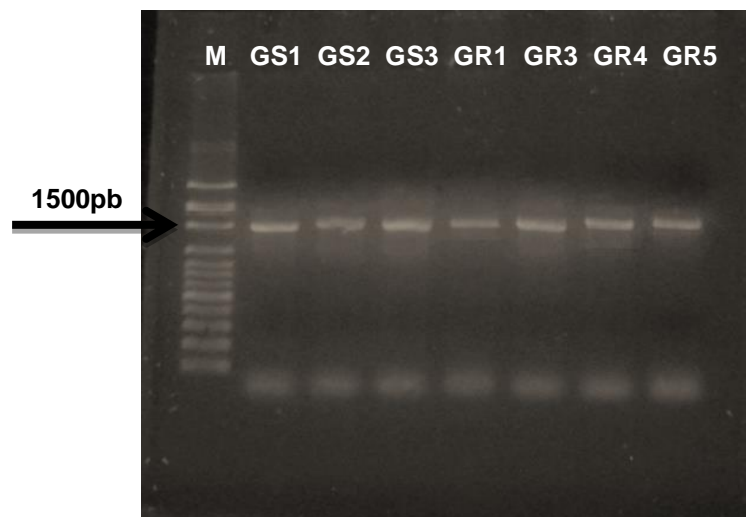


Figura 14. Produtos da amplificação do gene RNAr 16S de algumas linhagens isoladas do tecido de *S. stellata*. M - Marcador do peso molecular 100pb; GS_ e GR_ – linhagens isoladas da colônia sadia e roxa, respectivamente.

As 71 sequências parciais do gene RNAr 16S foram analisadas no BLAST e exibiram uma similaridade igual ou maior a 97% com as sequências do gene RNAr 16S depositadas no banco de dados GenBank (Tabela 9). Todas as linhagens isoladas e identificadas são representantes de duas das Classes do filo Proteobactéria: Alfa-proteobactéria e Gama-proteobactéria, distribuídos em 6 famílias (*Alteromonadaceae*, *Holomonadaceae*, *Pseudoalteromonadaceae*, *Rhodobacteraceae*, *Rhodospirillaceae* e *Vibrionaceae*) e 11 gêneros (*Citricella*, *Labrenzia*, *Pelagibaca*, *Thalassospira*, *Alteromonas*, *Cobetia*, *Glaciecola*, *Halomonas*, *Marinobacter*, *Pseudoalteromonas* e *Vibrio*).

Tabela 9. Identificação das linhagens isoladas do tecido da colônia sadia e roxa do coral *S.stellata* dos recifes de Cabo Branco, João Pessoa-PB baseada nas análises do BLAST das sequências de RNAr 16S.

Classe	Linhagem	Alinhamento mais significativo e semelhança com a sequência do gene 16S rRNA (%)
Alfa-proteobactéria	<u>GS27</u>	<i>Citricella thiooxidans</i> CHLG1 (99%)
	<u>GS10</u>	<i>Labrenzia alba</i> CECT5094 (99%)
	<u>GS19</u>	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601 (99%)
	GR14, GR16, <u>GR19</u> , GR20, GR29, GR30, GR32, GR40	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211(97-99%)
	<u>GR04</u>	<i>Thalassospira xiamenesis</i> M-5 (97%)
Gama-proteobactéria	<u>GR35</u>	<i>Alteromonas macleodii</i> Balearic Sea AD45 (97%)
	<u>GR03</u>	<i>Alteromonas marina</i> SW-47 (98%)
	GS07, GS12, <u>GS39</u>	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741 (98%)
	GS01, <u>GS28</u>	<i>Glaciecola agarilytica</i> NO2 (99%)
	<u>GS04</u>	<i>Halomonas nitroreducens</i> 11S (98%)
	GS06, GS09, <u>GS14</u> , GS17, GS24, GS29, GS30, GS31, GS32, GS40	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275 (97-99%)
	<u>GS08</u> , GS25, GS 36	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85 (97%)
	<u>GS16</u> , GR24	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 (99%)
	GS02, GS03, GS05, GS20, GS21, GS22, GS26, GS34, <u>GS35</u> , GS37	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2 (98-99%)
	<u>GS11</u> , GS13	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> KMM638 (99%)
	<u>GR26</u>	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> NCIMB2033 (98%)
	<u>GS33</u>	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> NCIMB8614 (100%)
	GS18, <u>GS23</u>	<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> KMM3548 (99-100%)
	<u>GR12</u>	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i> MB8-11 (98%)
	GR01, GR06, GR08, <u>GR15</u> , GR17, GR21, GR23, GR25, GR27, GR39	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280 (98-99%)
	GR05, <u>GR07</u> , GR11, GR31, GR33, GR37, GR38	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460 (97-99%)
	<u>GR22</u>	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM797 (98%)
	<u>GR09</u>	<i>Vibrio tubiashii</i> Milford 74 (99%)

GS: linhagens isoladas da colônia sadia de *S. stellata*

GR: linhagens isoladas da colônia roxa de *S. stellata*

As linhagens estão representadas nas Figuras 17 (GS_) e 18 (GR_).

As bactérias isoladas de *S. stellata* sadia e roxa pertenceram às classes Alfa-proteobactéria (17%) e Gama-proteobactéria (83%) (Tabela 9), sendo que a variedade dos gêneros de bactérias foi bastante distinta entre os isolados da colônia sadia e roxa. A microbiota associada aos corais é dinâmica, autorregulada e tem a capacidade de evitar a colonização de bactérias patogênicas (MOUCHKA; HEWSON; HARVELL, 2010).

Rohwer et al., (2002) e Bourne e Munn, (2005) relataram que as bactérias isoladas dos corais são geralmente representadas por classes Alfa-proteobactéria e Gama-proteobactéria. Na classe Alfa-proteobactéria estão as espécies de bactérias que conseguem sobreviver com baixos níveis de nutrientes e que podem provocar doenças nos corais, isto já foi observado, por exemplo, em trabalhos realizados com corais do gênero *Flavia* atingida por black band disease no Mar Vermelho e com colônias infectadas da espécie *S. stellata* no Caribe. Já as Gama-proteobactérias compõem o maior subgrupo em variedade de tipos fisiológicos e o segundo mais rico em gêneros perdendo apenas para o filo Firmicutes, também possui bactérias relacionadas com branqueamento e com outras doenças que acometem os corais (SEKAR et al., 2006; BARNEAH et al., 2007; SUNAGAWA et al, 2009; LINS-DE-BARROS et al., 2010; WILLIAMS et al, 2010; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Entre as linhagens de bactérias do coral sadio, 39% dos isolados pertenceram ao gênero *Pseudoalteromonas*, 37% ao gênero *Halomonas*, 7,9% ao gênero *Cobetia*, 5,2% ao gênero *Glaciecola* e 10,4% distribuídas entre os gêneros: *Citreicela*, *Labrenzia*, *Marinobacter* e *Pelagibaca*, tendo cada um dos gêneros com 2,6% de representatividade (Figura 15).

O gênero *Pseudoalteromonas* surgiu a partir de uma subdivisão das *Alteromonas*, sendo composto por 30 espécies de bactérias marinhas gram-negativas, aeróbicas, altamente capacitadas para sobreviver em ambientes pobres de nutrientes (GAUTHIER; GAUTHIER; CHRISTEN, 1995; IVANOVA et al., 2003; IVANOVA et al., 2004).

Estudo realizado por Shnit-Orland, Sivan e Ariel Kushmaro (2012), onde isolaram *Pseudoalteromonas* de várias espécies de corais e concluíram que essas bactérias secretam compostos ativos que apresentam atividade bactericida contra potenciais patógenos bacterianos Gram-positivos de corais exercendo um papel fundamental na defesa e conservação das colônias de corais.

As linhagens do gênero *Pseudoalteromonas* foram encontradas também entre as bactérias isoladas da colônia roxa de *S. stellata*, mas apenas 6% dos isolados pertenceram a esse gênero (Figura 16).

O gênero *Halomonas* pertencente à classe de Gama-proteobactérias é representado por bastonetes gram-negativos, halófilas e/ou halotolerantes, sendo isoladas

frequentemente de locais com alta concentração de sal (DOBSON; McMEEKIN; FRANZMA, 1993).

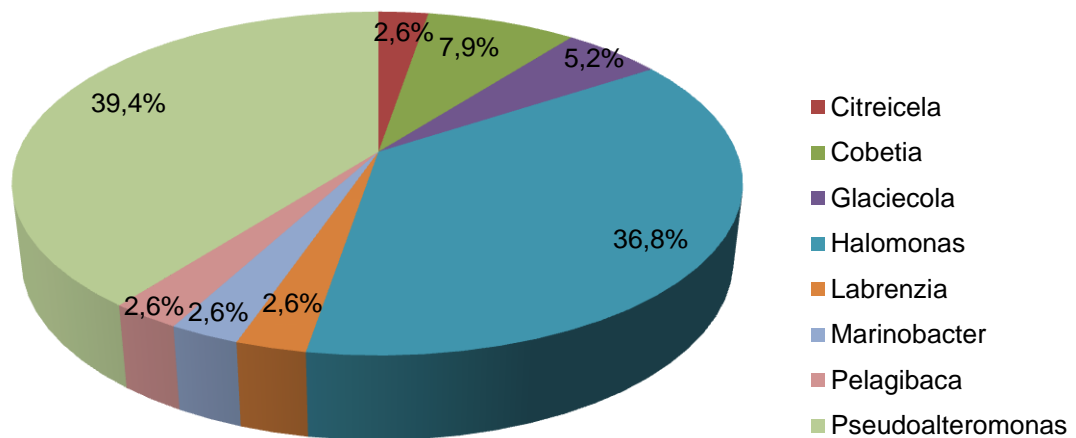


Figura 15. Percentual dos gêneros das linhagens de bactérias isoladas da colônia sadia do coral *S. stellata*.

Das linhagens isoladas do coral roxo 58% foram identificadas como pertencentes ao gênero *Vibrio*, enquanto que as bactérias desse gênero não foram observadas entre as linhagens isoladas do coral sadio (Figuras 15 e 16). Segundo gênero mais representativo entre os isolados da colônia roxa de *S. stellata* foi *Thalassospira* com 27,3% (Figura 16). Entre as bactérias isoladas da colônia roxa foram observadas também os gêneros *Alteromonas* (6%), *Pseudoalteromonas* (6%) e *Marinobacter* (3%) (Figura 16).

Vibrio é um gênero da ordem Vibronales pertencente à classe Gama-proteobactéria. Os membros dessa ordem são gram-negativos aeróbios facultativos e são classificados morfologicamente como bastonetes, muitas vezes, ligeiramente curvos e comumente encontrados em ambientes aquáticos (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

O gênero *Vibrio* apresenta espécies potencialmente virulentas para os corais (ALVES et al., 2010), como o caso do *Vibrio shiloi*, o agente causador do branqueamento na espécie *Oculina patagonica* do Mar Mediterrâneo (RESHEF et al., 2006). Os Vibrios estão associados às doenças de corais por ser um grupo bacteriano que tem sua proliferação favorecida pelo aumento da temperatura. Este fator pode provocar a expulsão dos simbiontes dos corais enfraquecendo o coral e deixando-o mais suscetível ao aparecimento de doenças (RITCHIE 2006; BOURNE et al., 2008). Apesar de várias espécies de *Vibrio*, como *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus* estarem relacionados com as doenças de corais, essas espécies são também importantes fixadores de nitrogênio (N_2), o que pode ter um efeito positivo sobre o coral (CHIMETTO et al., 2008).

Thalassospira (Classe Alfa-proteobactéria), etimologicamente significa organismo marinho de forma espiral, ou seja, as bactérias desse gênero são aeróbicas estritamente

marinhas e halófilas, além de serem capazes de viver em ambientes pobres em nutrientes e (LÓPEZ-LÓPEZ et al., 2002).

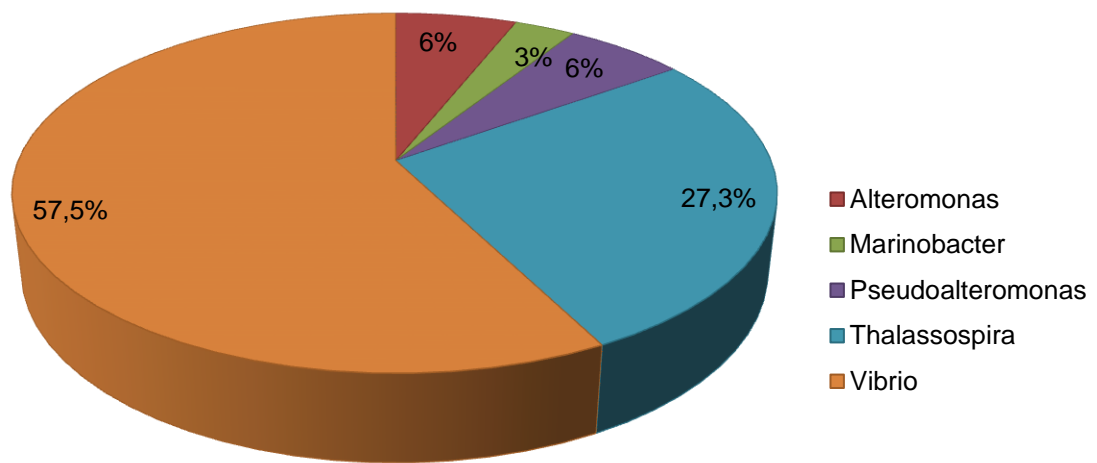


Figura 16. Percentual dos gêneros das linhagens de bactérias isoladas da colônia roxa do coral *S. stellata*.

Das 13 linhagens representativas do coral sadio usadas na construção da árvore, nove espécies pertencem as Gama-proteobactéria enquanto apenas três são Alfa-proteobactéria (Figura 17). *Pseudoalteromonas arctica* e *Halomonas saccharevitans* foram as espécies mais frequentes dentre os isolados do coral sadio, sendo que cada espécie foi representada por 10 linhagens.

Pseudoalteromonas arctica, isolada pela primeira vez do mar Ártico, é uma bactéria gram-negativa com forma de bastões curtos e flagelados, aeróbia, com temperatura de crescimento entre 4 e 25°C (KHUDARY et al., 2008).

As espécies do gênero *Halomonas*, pertencente à classe de Gama-proteobactéria foram isoladas de diversos ambientes salinos tais como lagos, areia e solos, ambientes marinhos, animais, etc. (Xu et al, 2007). *Halomonas saccharevitans* é uma espécie de cocos gram-negativos, móveis e aeróbios (Xu et al., 2007).

Dentre as 11 linhagens representativas do coral roxo utilizadas na construção da árvore, nove pertenceram à classe Gama-proteobactéria e duas a classe Alfa-proteobactéria (Figura 18) e da totalidade dos isolados do coral roxo (33 linhagens) 10 apresentaram similaridade >97% com a espécie *Vibrio harveyi*. O *Vibrio harveyi* é um micro-organismo marinho, gram-negativo que se movimenta utilizando flagelo, anaeróbio facultativo e bioluminescente. É uma espécie patogênica de animais marinhos, sejam eles vertebrados ou invertebrados, como peixes e corais, conhecida por atacar criações de camarões economicamente importantes na Ásia e na América do Sul (AUSTIN; ZHANG, 2006; OWENS et al., 2006). Segundo Dinsdale et al. (2008), *Vibrios* spp. sob condições de

estresse podem passar a atuar como patógenos oportunistas competindo com as espécies de bactérias presentes normalmente no muco do coral.

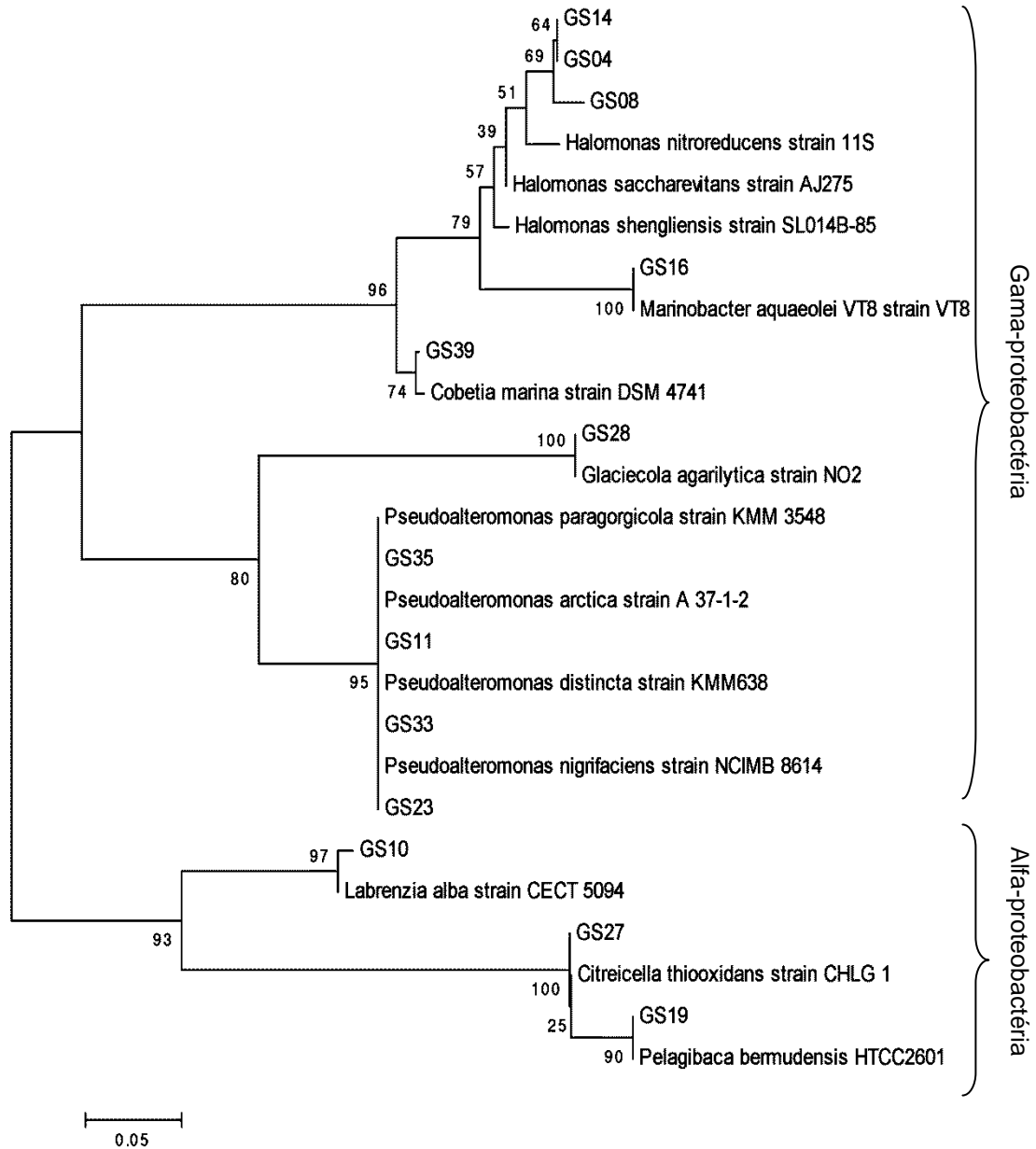


Figura 17. Árvore filogenética de bactérias isoladas da colônia sadia de *S. stellata* dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB, baseada nas sequências do gene RNAr 16S. A árvore filogenética foi construída por meio do *Maximum Likelihood Method* baseado no modelo Kimura 2.

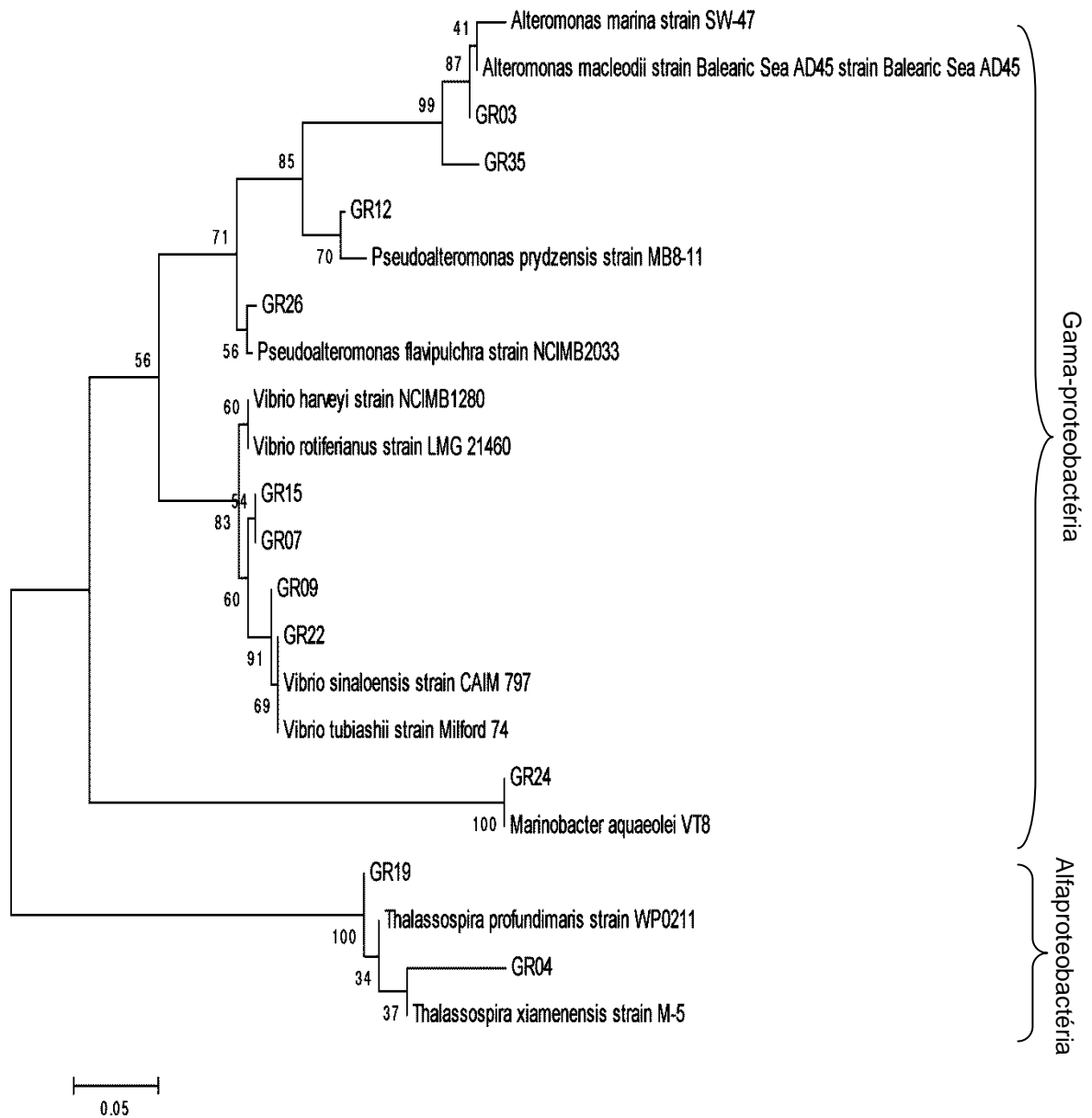


Figura 18. Árvore filogenética de bactérias isoladas da colônia roxa de *S. stellata* dos recifes de corais de Cabo Branco, João Pessoa-PB, baseada nas sequências do gene RNAr 16S. A árvore filogenética foi construída por meio do *Maximum Likelihood Method* baseado no modelo Kimura 2

5. CONCLUSÕES

- Os parâmetros físico-químicos (temperatura, pH, oxigênio dissolvido e turbidez) de água dos recifes e da praia de Cabo Branco, João Pessoa-PB, apresentaram variações ao longo do estudo, com maiores flutuações observadas para oxigênio dissolvido e turbidez.
- A água dos recifes de corais do Cabo Branco, João Pessoa-PB, apresentou níveis de coliformes fecais, *Escherichia coli* e enterococos dentro dos padrões recomendados pela legislação brasileira caracterizando assim uma água de baixa contaminação fecal não chegando a prejudicar a salubridade do ambiente.
- Os meses de verão (dezembro, janeiro e fevereiro) favoreceram o aumento da densidade de bactérias heterotróficas totais e *Vibrio* spp. na água do mar.
- As bactérias isoladas de *Siderastrea stellata* sadia e roxa pertenceram às classes Alfa-proteobactéria e Gama-proteobactéria, apresentando grande diferença na composição dos gêneros de bactérias entre colônia sadia e roxa.
- Maior proporção de bactérias do gênero *Vibrio* observada entre os isolados de colônia roxa, pode sugerir sua possível contribuição no processo de alteração de pigmentação das colônias de *S. stellata*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMAS, M.; KETTENFELD, M. The role of turbidity as a constraint on predator-prey interactions in aquatic environments. **Behav. Ecol. Sociobiol.** v. 40, n.3, p. 169-174. 1997.
- AESA – **Agência Executiva de Gestão das Águas do Estado da Paraíba**. Disponível em: <http://site2.aesa.pb.gov.br/aesa/monitoramentoPluviometria.do?metodo=listarMesesChuvasMensais>. Acesso em 01 março 2013.
- ALLEMAND, D. et al. Organic matrix synthesis in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: role in biomineralization and potential target of the organotin tributyltin. **The Journal of Experimental Biology**.v.201, n.13, p. 2001-2009. 1998.
- ALVES, N. Jr. et al. Diversity and pathogenic potential of vibrios isolated from Abrolhos bank corals. **Environmental Microbiology Reports**. v. 2, n. 1, p. 90-95. 2010.
- ANTHONY, K. R. N. et al. Ocean acidification causes bleaching and productivity loss in coral reef builders. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)**. v.105, n.45, p.17442–17446. 2008.
- ANTHONY, K. R. N.;CONNOLLY, S. R. Environmental limits to growth: physiological niche boundaries of corals along turbidity–light gradients. **Ecophysiology**, v.141, n.3, p.373-384. 2004.
- ANTHONY, K. R. N.; FABRICIUS, K. E. Shifting roles of heterotrophy and autotrophy in coral energetics under varying turbidity. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**.v.252, n.2, p.221-253. 2000.
- ANTONIUS, A. **New observations on coral destructions in reefs**. In: 10th Meeting of the association of island marine laboratories of the Caribbean, Mayaguez, p.3, 1973.
- APHA - American Public Health Association. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19^a ed. Washington: American Public Health Association. 1995, p. 1155p.
- ARONSON, R. B.; PRECHT, W. F. White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. **Hydrobiologia**. v.460, n.1, p. 25-38. 2001.
- AUSTIN, B.; ZHANG, X-H. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. **Lett Appl Microbiol**. v.43, n.2, p.119-24. 2006.
- BAIRD, C. **Química Ambiental**. Tradução por M.A.L. Recio e L. C. M Carrera. 2^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- BAKER, A. C.; GLYNN, P. W.; RIEGL, B. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of longterm impacts, recovery trends and future outlook. **Estaur. Coast Shelf S.**, v.80, n.4, p.35–71. 2008.
- BARNEAH, O. et al. Characterization of black band disease in red sea stony corals. **Environ. Microbiol**. v.9, n.8, p.1995–2006. 2007.
- BERKELMANS, R.; VAN OPPEN, M. J. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals: a'nugget of hope' for coral reefs in an era of climate change. **Proceedings the Royal Society**. v. 213, n. 1599, p. 2305-2312. 2006.

- BONGIORNI, L.; RINKEVICH, B. The pink-blue spot syndrome in *Acropora eurystoma* (Eilat, Red Sea): A possible marker of stress? **Zoology**.v.108, n.3, p. 247–256, 2005.
- BOURNE, D. et al. Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. **Isme Journal**. v.2, n.4, p.350–363. 2008.
- BOURNE, D. G.; MUNN C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environ. Microbiol.**, v.7, n.8, p.1162–1174. 2005.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente CONAMA. Resolução nº 274, de 29 de novembro de 2000. Define os critérios de balneabilidade em águas brasileiras. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 25 dez. 2001. Seção 1, p. 70-71. Disponível em:<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=272>. Acesso em: 05 dezembro 2012.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente CONAMA. Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 18 mar. 2005. p. 58-63. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>. Acesso em: 05 dezembro 2012.
- BROWN, B. E.; BYTHELL, J. C. Perspectives on mucus secretion in reef corals. **Marine Ecology Progress Series**. v. 296, p. 291-309. 2005.
- BROWNE, N. K.; SMITHERS, S. G.; PERRY, C. T. Spatial and temporal variations in turbidity on two inshore turbid reefs on the Great Barrier Reef, Australia. **Coral Reefs**, v.32, n.1, p.195-210. 2012.
- BRUSCA, R.C.; G. J. BRUSCA. **Invertebrados**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.
- CARVALHO, A. R.; SCHLITTLER, F. H. M.; TORNISIELO, V. L. Relações da atividade agropecuária com parâmetros físicos químicos da água. **Química Nova**. v. 23, n.5, p.618-622 .2000.
- CASTRO, A. P. et al. Bacterial community associated with healthy and diseased reef coral *Mussismilia hispida* from Eastern Brazil. **Microb. Ecol.**, v.59, n.4, p.658–667. 2010.
- CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. **Bull. mar. Science**, v.69, n.2, p.357-371, 2001.
- CAVALLO, R. A. et al. Viable heterotrophic bacteria in water and sediment in 'Mar Piccolo' of Taranto (Ionian Sea, Italy). **Journal of Applied Microbiology**. v.86, n.6, p. 906–916. 1999.
- CERVINO, J. M. et al. Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. **Appl. Environ. Microbiol.**v.70, n.11, p.6855–6864. 2004.
- CHENG, H.R.; JIANG, N. Extremely rapid extraction of DNA from bacterial and yeast. **Biotechnology letters**.v.28, n.1, p.55-59. 2006.
- CHIMETTO, L. A. et al. Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Syst. Appl. Microbiol.** v.31, n.4, p.312–319. 2008.

COLES, S. L.; JOKIEL, P. L. Synergistic effects of temperature, salinity and light on the hermatypic coral *Montipora verrucosa*. **Mar. Biol.** v.49, n.3, p.187–195. 1978.

CONNELL, J. H. Diversity in tropical rain forests and coral reefs. **Science**, v. 199, n. 4335, p. 1302-1310. 1978.

CORREIA, M. D. **Ecosistemas marinhos: recifes, praias e manguezais**. Maceió: EDUFAL, 2005.

COSTA, C. F. **Estudo eco-fisiológico e molecular dos dinoflagelados simbiotes de *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) dos ambientes recifais do Cabo Branco, Paraíba - Brasil, sob condições de estresses naturais e provocados artificialmente**. 2006. 156p. Tese (Doutorado em Zoologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

COSTA, C. F. et al. Microsymbionts of *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) in coastal reefs of Cabo Branco, state of Paraíba, Northeastern Brazil. **Tropical Oceanography**. v. 32, n. 2, p. 171-179. 2004.

COSTA, C. F.; AMARAL, F. D. Density and size differences of symbiontes dinoflagellates from five reef-building coral species from Brazil. In: **Proceed. 9th Intern. Coral Reef Symp.**, Bali, Indonesia, v. 1, p. 23-27. 2000.

COSTA, C. F.; SASSI, R.; AMARAL, F. D. Annual cycle of symbiotic dinoflagellates from three species of scleractinian corals from coastal reefs of northeastern Brazil. **Coral Reefs**, v.24, n.2, p.191-193. 2005.

COSTA, C. F.; SASSI, R.; GORLACH-LIRA, K. Zooxanthellae genotypes in the coral *Siderastrea stellata* from coastal reefs in northeastern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.367, n.2, p.149–152. 2008.

CROOK, E. D. et al. Calcifying coral abundance near low-pH springs: implications for future ocean acidification. **Coral Reefs**. v. 31, n. 1, p. 239-245. 2012.

CROQUER, A.; PAULS, S. M.; ZUBILLAGA, A. L. White plague disease outbreak in a coral reef at Los Roques National Park, Venezuela. **Revista Biol. Trop.**, v.51, p. 39-45. 2003.

DENNER, E. B. M. et al. *Aurantimonas coralicida* gen. nov. sp. Nov., the causative agent of white plague type II on Caribbean scleractinian corals. **Int.J. Syst. Evol. Microbiol.**, v.53, n.4, p.1115-1122. 2003.

DINSDALE, E. A. et al. Microbial ecology of four coral atolls in the northern Line Islands. **Plos One**, v. 3, n.2, p.1584. 2008.

DOBSON, S. J.; McMEEKIN, T. A.; FRANZMA, P. D. Phylogenetic relationships between Genera *Deleya*, *Halomonas*, some members of the and *Halovibrio*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.43, n.4, p. 665-673. 1993.

DONEY, S. C. et al. Ocean acidification: a critical emerging problem for the ocean sciences. **Oceanography**, v.22, n. 4, p.16–25. 2009.

DOVE, S.G.; TAKABAYASHI, M.; HOEGH-GULDBERG, O. Isolation and partial characterization of the pink and blue pigments of Pocilloporid and Acroporid corals. **Biol. Bull.**, v.189, n.3, p.288–297. 1995.

DUSTAN, P. Distribution of zooxanthella and photosynthetic chloroplast pigment of the reef building coral *Montastrea annularis* Ellis and Solander in relation to depth on a West Indian coral reef. **Bull. Mar. Science**, v. 29, n.1, p. 79-95. 1979.

EATON, A. D.; CLESCERI, L. S.; GREENBERG, A. E. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 19^a ed. – Washington, DC: APHA, 1995.

ERFTEMEIJER, P. L. A. et al. Environmental impacts of dredging and other sediment disturbances on corals: a review. **Marine Pollution Bulletin**. v. 64, n.9, p. 1737-1765. 2012.

FABER, J. M. et al. Molecular typing and differentiation. In: FABER, J. M. et al. (Org.) **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington, D.C.: APHA, 2001. Cap. 11, p. 127-158.

FARIAS, G. M.; SASSI, R.; COSTA, C. F.. Susceptibilidade de *Siderastrea stellata* Verrill, 1880, ao branqueamento e ao aparecimento de doenças em poças de maré dos recifes costeiros do Cabo Branco, Paraíba. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia, 2012, Rio de Janeiro. **Resumos do Congresso Brasileiro de Oceanografia**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Oceanografia (AOCEANO), 2012.

FARIAS, M. S. S. et al. Impactos ambientais em uma baía urbana e as consequências na qualidade da água superficial. **Enciclopédia Biosfera**. n.5. 2008.

FAUTIN, D. G.; BUDDEMEIER, R. W. Adaptive bleaching: a general phenomenon. **Hydrobiologia**, v.530/531, n.1-3, p.459-467. 2004.

FINE, M.; TCHERNOV, D. Scleractinian coral species survive and recover from decalcification. **Science**. v. 315, n.5820, p.1811. 2007.

FIORUCCI, A. R.; BENEDETTI FILHO, E. A importância do oxigênio dissolvido em Ecossistemas Aquáticos. **Química e Sociedade**, n.22, p.10-16. 2005.

FRIAS-LOPEZ, J. et al. Bacterial community associated with Black Band Disease in corals. **Applied and Environmental Microbiology**. v. 70, n. 10, p. 5955-5962. 2004.

FUHRMAN J. A. et al. Annually reoccurring bacterial communities are predictable from ocean conditions. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.103, n.35, p.13104-13109. 2006.

FURLA, P. et al. Functional polarity of the tentacle of the sea anemone *Anemonia viridis*: role in inorganic carbon acquisition. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. v.43, n.2, p. 303-310. 1998.

FURLA, P. et al. Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. **The Journal of Experimental Biology**. v.203, n.22, p. 3445-3457.2000.

GAMA, P. B. **Aspectos ecológicos e biológicos de esponjas e de ascícias da região de entre-maré da Praia do Cabo Branco, Joao Pessoa, Paraíba, Brasil**. 2003. 130p. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

GANDRA, E. A. et al. Técnicas moleculares aplicadas à microbiologia de alimentos. **Acta Sci. Technol. Maringá**. v. 30, n. 1, p. 109-118. 2008.

GAUTHIER, G.; GAUTHIER, M.; CHRISTEN, R. Phylogenetic Analysis of the Genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* Using Genes Coding for Small-Subunit rRNA

Sequences and Division of the Genus *Alteromonas* into Two Genera, *Alteromonas* (Emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and Proposal of Twelve New Species Combinations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** v.45, n.4, p. 755-761. 1995.

GERHARDT, P. et al. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. ASM Press, Washington, 179-215. 1994.

GIL-AGUDELO, D. L.; SMITH G.W.; WEIL, E. The white band disease type II pathogen in Puerto Rico. **Rev. Biol. Trop.** v.54, n.3, p.59–67. 2006.

GLYNN, B. et al. Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. **International Journal of Dairy Technology**. v.59, n. 2, p. 126-139. 2006.

GLYNN, P. W. Coral reef bleaching: ecological perspectives. **Coral Reefs**. v.12, n.1, p. 1-17. 1993.

GÓMEZ-CABRERA, M. del. et al. Acquisition of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium*) by juveniles of the coral *Acropora longicyathus*. **Coral Reefs**. v. 27 , n. 1, p. 219-226. 2008.

GONDIM, A. I. et al. Echinodermata da Praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Biota Neotrop.** v.8, n.2, p.151-159. 2008.

GOOGLE EARTH-MAPS. Disponível em: <http://www.google.com/earth/index.html>. Acesso em: 10 de abril 2013.

GUPPY, R.; BYTHELL, J. C. Environmental effects on bacterial diversity in the surface mucus layer of the reef coral *Montastraea faveolata*. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v. 328, p.33–42. 2006.

HARVELL, C. D.; et al. Emerging marine diseases: Climate links and anthropogenic factors. **Science**, v.285, n.15, p.05–10. 1999.

HARVELL, D. Ecology and evolution of host-pathogen interactions in nature. **Am.Nat.**, v.164, n.5, p.S1–5. 2004.

HARVELL, D. et al. Coral disease, environmental drivers, and the balance between coral and microbial associates. **Oceanography**, v.20, n.1, p.172–195. 2007.

HEWSON, I. et al. Remarkable heterogeneity in meso- and bathypelagic bacterioplankton assemblage composition. **Limnol.Oceanogr.**, v.51, n.12, p.74–83. 2006a.

HEWSON, I. et al. Temporal and spatial scales of variation in bacterioplankton assemblages of oligotrophic surface waters. **Mar. Ecol. Prog. Ser.**, v.311, p.67–77. 2006b.

HOEGH-GULDBERG, O. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine and Freshwater Research**. v.50, n.8, p.839-866. 1999.

HUGENHOLTZ, P.; GOEBEL, B. M.; PACE, N. R. Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity. **J.Bacteriol.** v.180, n.24, p. 4765-4774. 1998.

HUGHES T. P., et al. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science**, v.301, n.92, p.9–33. 2003.

- IVANOVA, E. P. et al. Characterization of *Pseudoalteromonas* distinctalike sea-water isolates and description of *Pseudoalteromonas aliena* sp. nov. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** v.54, n.5, p.1431–1437. 2004.
- IVANOVA, E. P. et al. Ecophysiological variabilities in ectohydrolytic enzyme activities of some *Pseudoalteromonas* species, *P. citrea*, *P. issachenkonii*, and *P. nigrifaciens*. **Curr. Microbiol.** v.46, n.1, p.6–10. 2003.
- KAMIZOULIS, G.; SALIBA, L. Development of coastal recreational water quality standards in the Mediterranean. **Environment International**, v.30, n.6, p. 841-854. 2004.
- KERSWELL, A. P.; JONES, R. J. Effects of hypo-osmosis on the coral *Stylophora pistillata*: nature and cause of 'low-salinity bleaching'. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v. 253, n.1964, p.145–154. 2003.
- KHUDARY, R. A. et al. *Pseudoalteromonas arctica* sp. nov., an aerobic, psychrotolerant, marine bacterium isolated from Spitzbergen. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 58, p.2018–2024. 2008.
- KLAUS, J. S. et al. Bacterial communities inhabiting the healthy tissues of two Caribbean reef corals: interspecific and spatial variation. **Coral Reefs**, v.24, n.12, p.9-37. 2005.
- KLEYPAS, J. A. Coral reef developement under naturally turbid conditions: fringing reefs near Broad Sound, Australia. **Coral Reefs**.v.15, n. 3, p. 153-167. 1996.
- KÜHL, M. et al. Microenvironment and photosynthesis of zooxanthellae in scleractinian corals studied with microsensors for 0,2 pH and light. **Marine Ecology Progress Series**.v.117 , p. 159-172. 1995.
- KUSHMARO, A. et al. *Vibrio shiloi* sp. nov., the causative agent of bleaching of the coral *Oculina patagonica*. **Int. J. System. Evol. Microbiol.**v.51, n.4, p.1383–1388. 2001.
- LABOREL, J. Madreporaires et hydrocoralliaires récifaux des cotes brésiliennes. **Rés Sci Camp Calypso**, v.9, n. 25, p.171-229, 1970.
- LAMPERT, Y. et al. Phylogenetic diversity of bacteria associated with the mucus of Red Sea corals. **FEMS Microbiol. Ecol.**, v.64, n.18, p.7–98. 2008.
- LEÃO, Z. M. de A. N. **Guia para identificação dos corais do Brasil**. 1986. 186p. Programa de Pesquisa de Pós-graduação em Geociências Instituto de Geociências Universidade Federal da Bahia.
- LEÃO, Z. M. de A. N. O complexo recifal mais extenso do Oceano Atlântico Sul. In: Schobbenhaus, C.; Campos, D.A.; Queiroz, E.T.; Winge, M.; Berbert-Born, M. (Edit.) **Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**, 1999. Disponível: em: <<http://www.unb.br/ig/sigep/sitio090/sitio090.htm>.> Acesso em: 05 Ago 2001.
- LEÃO, Z. M. de A. N. The coral reefs of Bahia. In: HETZEL, B. and CASTRO, C.B. **Corals of Southern Bahia**. Rio de Janeiro: Nova Fronteria, 1994. p. 152-159.
- LEÃO, Z. M. de A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; OLIVEIRA, M. de D. M. Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. **Biota Neotrop.** v.8, n.3, p.69-82. 2008.

- LEÃO, Z. M. de A. N.; KIKUCHI, R. K. P.; TESTA V. **Corals and coral reefs of Brazil**. In: J. Cortês (Org.). *Latin America Coral Reefs*. Amsterdam, Elsevier, 2003. p. 9-52.
- LENTZ, J. A.; BLACKBURN, J. K.; CURTIS, A. J. Evaluating Patterns of a White-Band Disease (WBD) Outbreak in *Acropora palmata* Using Spatial Analysis: A Comparison of Transect and Colony Clustering. **Plos One**. v. 6, n. 7, p.1-10. 2011.
- LIÑÁN-CABELLO, et al. Response to short term ultraviolet stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). **Rev. Biol. Trop.** V. 58, n.1, p.103-118. 2010.
- LINS-DE-BARROS, M. M. et al. Archaea, Bacteria, and Algal Plastids Associated with the Reef-Building Corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. **Microb.Ecol.**, v.59, n.3, p.523–532. 2010.
- LITTMAN, R. A. et al. Diversities of coral-associated bacteria differ with location, but not species, for three acroporid corals on the Great Barrier Reef. **FEMS Microbiology Ecology**., v.68, n.2, p.152-163. 2009.
- LONG, R. A.; AZAM, F. Microscale patchiness of bacterioplankton assemblage richness in seawater. **Aquat.Microb.Ecol.**, v.26, n.10, p.3–13. 2001.
- LÓPEZ-LÓPEZ, A. et al. *Thalassospira lucentensis* gen. nov., sp. nov., a new marine member of the α -Proteobacteria. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 52, p.1277–1283. 2002.
- MAKKAVEEV, P. N. The Features of the correlation between the pH values and the dissolved oxygen at the Chistaya Balka Test Area in the Northern Caspian Sea. **Oceanology**, v. 46, n4, p. 466-472. 2009.
- MALORNY, B. et al. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. **Int. J. Food Microbiol.** v. 83, n. 1, p. 39-48. 2003.
- MAO-JONES, J. et al. How microbial community composition regulates coral disease development. **PLoS Biology**. v. 8, n. 3. 2010.
- MARHAVER, K. L.; EDWARDS, R. A.; ROHWER, F. Viral communities associated with healthy and bleaching corals. **Environmental microbiology**, v.10, n.9, p.2277-2286. 2008.
- MARUBINI, F. et al. Coral calcification responds to seawater acidification: a working hypothesis towards a physiological mechanism. **Coral Reefs**, v. 27, n. 3 , p. 491-499. 2008.
- MONTANARI, M. P. et al. Vibrios associated with plankton in a coastal zone of the Adriatic Sea (Italy). **FEMS Microbiology Ecology**, v. 29, n.3, p.241-247. 1999.
- MOREIRA, P. de P.; REUSS-STENZEL, G. M. Mapeamento de habitats do recife de coral Pedra de Leste, Abrolhos, utilizando uma imagem multiespectral Landsat7 ETM+. In: XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto. Ihéus. **Anais do XIV Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. Natal: INPE, 2009.
- MOUCHKA, M. E.; HEWSON, I.; HARVELL, C. D. Coral-associated bacterial assemblages: current knowledge and the potential for climate-driven impacts. **Integrative and Comparative Biology**, v.50, n.4, p.662-674. 2010.

- MULLER, E. M.; van WOESIK, R. Black-band disease dynamics: Prevalence, incidence, and acclimatization to light. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v.397, n.1, p. 52-57. 2011.
- MUMBY, P. J. et al. Cloudy weather may have saved Society Island reef corals during the 1998 ENSO event. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.222, n.5, p. 209-216. 2001.
- MUSCATINE, L. The role of symbiotic algae in carbon and energy flux in reef corals. In DUBINSKY, Z. (Org.). **Ecosystems of the world 25: Coral Reefs**, New York: Elsevier, 1990. p.75-84.
- NUNES, F. L. D.; NORRIS, R. D.; KNOWLTON, N. Long Distance dispersal and connectivity in amphiatlantic corals at regional and basin scales. **PLoS ONE** .v.6, n.7, p.1-9. 2011.
- OWENS, L.; BUSICO-SALCCEDO, N. "*Vibrio harveyi*: Pretty Problems in Paradise. In: THOPSON, et al. *The Biology of Vibrios*. ASM Press, 2006. Cap. 19.
- PORTER, J. W. et al Primary production and photoadaptation in light and shade-adapted colonies of the symbiotic coral, *Stylophora pistillata*. **Proc. R. Soc. Lond.**, v.222, n.1227, p.161–180. 1984.
- RAPPÉ, M. S.; GIOVANNONI, S. J. The uncultured microbial majority. **Annu. Rev. Microbiol.**, v.57, p.369-394, 2003.
- REIS, A. M. M. et al. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **J. Appl. Microbiol.**, v.106, n.13, p.78–87. 2009.
- RESHEF, L. et al. The coral probiotic hypothesis. **Environ. Microbiol.**, v.8, n.12, p.2068–2073. 2006.
- RICHARDSON, L. L. Coral diseases: what is really know? **Trends Ecol. Evol.**, v.13, n.11, p.438-443. 1998.
- RICHARDSON, L. L.; KUTA, K.G. Ecological physiology of the black band disease cyanobacterium *Phormidium coralyticum*. **FEMS Microbiol. Ecol.** v.43, n.3, p. 287–298. 2003.
- RICHARDSON, L.L. Black band disease. In: ROSENBERG, E.; LOYA, Y. (Eds.). **Coral Health and Disease**. Berlin: Springer-Verlag, 2004. p. 325–336.
- RINKEVICH, B., SAKAI, K. Interspecific interactions among species of the coral genus *Porites* from Okinawa, Japan. **Zoology**, v.104, n.2, p.91–97. 2001.
- RITCHIE, K. B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.322, p.15–27. 2006.
- ROHWER, F. et al. Diversity and distribution of coral-associated bacteria. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.243, p.1-10. 2002.
- ROHWER, F. et al. Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastraea franksi*. **Coral Reefs**, v. 20, n. 1, p. 85–91. 2001.
- ROSA, S. R.; ROSA, I. L.; ROCHA, L. A. Diversidade da ictiofauna de poças de maré da praia do Cabo Branco, João Pessoa, Paraíba, Brasil. **Rev. Bras. de Zoologia**, v.14, n.1, p. 201-212. 1997.

ROSENBERG, E. et al. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nat. Rev. Microbiol.** v.5, n.5, p.355–362. 2007.

ROSENBERG, E. BEN-HAIM, Y. Microbial diseases of corals and global warming. **Environ. Microbiol.** v.4, n.6, p.318–326. 2002.

RYPHEN, K. L.; WARD, J. R.; AZAM, F. Antagonistic interactions among coral-associated bacteria. **Environmental Microbiology.** V.12, n.1, p.28-39. 2010.

SANTOS, M. G. **Comparação morfológica de *Favia grávida* e *Siderastrea stellata* (Cnidaria: Scleractinia) do Brasil com espécies congêneres do Caribe Panamenho.** 2003. 97p. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

SASSI, R. et al. Pigmentation patterns of *Siderastrea* spp. from coastal reefs in Northeastern Brazil and its relation with zooxanthellae and other microsymbionts. Submetido para **Tropical Oceanography**, 2013.

SASSI, R.; KUTNER, M. B. B.; MOURA G. F. Studies on the decomposition of drift seaweed from the northeast Brazilian coastal reefs. **Hidrologia**, v.157, n.2, p.187-192. 1987.

SASSI, R.; MELO, G. N. Hyaline Tintinnina (Protozoa-Ciliophora-Oligotrichida) from northeast Brazilian coastal reefs. **Bol. Inst. Oceanogr.** v.37, n.1, p. 59-74. 1989.

SEGAL, B.; CASTRO, C. B. Slope preferences of reef corals (Cnidaria, Scleractinia) in the Abrolhos Archipelago, Brazil. **Boletim do Museu Nacional.** v.418, p.1-10, 2000.

SEKAR, R. et al. Microbial communities in the surface mucopolysaccharide layer and the black band microbial mat of black band-diseased *Siderastrea siderea*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v.72, n.59, p.63-73. 2006.

SHNIT-ORLAND, M; SIVAN, A.; KUSHMARO, A. Antibacterial Activity of *Pseudoalteromonas* in the Coral Holobiont. **Microb.Ecol.**v.64, n.4, p.851-859. 2012.

SKYSCRAPERCITY. Disponível em: www.skyscrapercity.com. Acesso em 09 de abril 2012.

SPALDING, M. D.; RAVILIOUS, C.; GREEN, E. P. **World atlas of corals reefs.** Berkely: UNEP/WCMC, 2001.

SPERLING, M. V. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos.** 3ª ed. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, v.1. 2005.

SUNAGAWA, S. et al. Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. **The ISME Journal.** v.3, n.5, p. 512–521. 2009.

SUSSMAN, M. et al. Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. **PLoS ONE.**v.3, n.6, p. e2393. 2008.

SZMANT, A. M.; GASSMAN, N. J. The effects of prolonged bleaching on the tissue biomass and reproduction of the reef coral *Montastrea annularis*. **Coral Reefs**, v.8, n.4, p.217-224. 1990.

TAKABAYASHI, M., HOEGH-GULDBERG, O. Ecological and physiological differences between two colour morphs of the coral *Pocillopora damicornis*. **Mar. Biol.**, v.123, n.4, p.705–714. 1995.

TAMURA, K. et al. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.** v.28, n.10, p. 2731–2739. 2011.

THURMAN, H.V. Animals of benthic environment. In: THURMAN, H.V. (Org.) **Introductory Oceanography**. 8 ed. New Jersey: Prentice-Hall, 1997. p. 428-459.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. Tradução por Aristóboles Mendes da Silva. 10ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2012.

Van DUIN, E. et al. Modeling underwater light climate in relation to sedimentation, resuspension, water quality and autotrophic growth. **Hydrobiologia**, v.444, n.1, p.25-42. 2001.

Van WOESIK, R. Lesion healing on massive *Porites spp.* corals. **Mar. Ecol. Prog. Ser.** v.164, p.213–220. 1998.

VELÁZQUEZ, E. et al. *Mesorhizobium chacoense* sp. nov., a novel species that nodulates *Prosopis alba* in the Chaco Arido Region (Argentina). **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 51, n. 3, p.1011-1021. 2001.

VILLAÇA, R. C. Recifes Biológicos. In: PEREIRA, R.C; SOARES-GOMES, A. (Org.). **Biologia Marinha**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência, 2009. p. 399-420.

WEIL, E.; SMITH, G.; GIL-AGUDELO, D. L. Status and progress in coral reef disease research. **Dis. Aquat. Organ.**, v.69, n.1, p.1–7. 2006.

WILLIAMS, K. P. et al. **Phylogeny of Gammaproteobacteria**. *Journal of Bacteriology*. v. 192, n.9, p. 2305–2314. 2010.

WOESE, C. R. Bacterial evolution. **Rev.Microbiol.** v.51, n.2, p. 221-271. 1987.

WOESE, C. R. Interpreting the universal phylogenetic tree. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA (PNAS)**. v. 97, n. 15, p. 8392-8396. 2000.

XIUBAO, L. et al. Effects of the multiple stressors high temperature and reduced salinity on the photosynthesis of the hermatypic coral *Galaxea fascicularis*. **Acta Ecologica Sinica**. v. 29, n. 3, p. 155-159. 2009.

XU, X. et al. *Halomonas saccharevitans* sp. nov., *Halomonasarcis* sp. nov. and *Halomonas subterranea* sp. nov., halophilic bacteria isolated from hypersaline environments of China. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 57, p.1619–1624. 2007.

ZIRINO, A. et al. pH-temperature-nutrient relationships in the eastern tropical Pacific Ocean. **The Science of the Environment**.v.5, n. 1-2, p. 117-137. 1986.

ANEXOS

ANEXO A – Valores dos parâmetros físico-químicos medidos na água da praia de Cabo Branco no período de outubro/2011 a setembro/2012

Mês	Parâmetros				
	Temperatura (°C)	pH	Salinidade	Oxigênio dissolvido (DO mg/L)	Turbidez (UNT)
Outubro/2011	30,9	8,5	34,9	2,3	180,8
Novembro/2011	30,1	9,2	33,5	6,6	113,4
Dezembro/2011	29,3	8,7	33,5	7,2	75,9
Janeiro/2012	30,1	9,5	31,9	8,9	129,2
Fevereiro/2012	29,8	9,7	31,5	11,2	219,9
Março/2012	29,9	8,9	34,4	6,0	353,6
Abril/2012	29,5	8,7	35,0	5,1	66,5
Maió/2012	29,7	8,8	34,8	6,4	44,8
Junho/2012	27,3	9,2	32,9	5,2	81,7
Julho/2012	29,0	9,2	32,6	4,1	95,5
Agosto/2012	28,4	8,5	33,1	3,0	238,5
Setembro/2012	27,4	8,9	34,1	2,3	223,6

ANEXO – B: Resultados das comparações de todas as linhagens isoladas da colônia de *S. stellata* sadia com as sequências parciais do gene RNAr 16S depositadas no GenBank.

Linhagem	Alinhamento mais significativo	Código de Acesso	Valor E	Máxima identidade (%)
GS01	<i>Glaciacola agarilytica</i> NO2		1e-170	99
GS02	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		1e-170	99
GS03	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		8e-106	99
GS04	<i>Halomonas nitroreducens</i> 11S	KF784858*	0.0	98
GS05	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		2e-179	99
GS06	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		0.0	98
GS07	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741		2e-164	98
GS08	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85	KF784859	0.0	97
GS09	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		0.0	99
GS10	<i>Labrenzia alba</i> CECT5094	KF784860	0.0	99
GS11	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> KMM638	KF784861	0.0	99
GS12	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741		3e-156	98
GS13	<i>Pseudoalteromonas distincta</i> KMM638		0.0	99
GS14	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275	KF784862	0.0	99
GS16	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8 strain VT8	KF784863	0.0	99
GS17	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		4e-135	97
GS18	<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> KMM3548		0.0	99
GS19	<i>Pelagibaca bermudensis</i> HTCC2601	KF784864	0.0	99
GS20	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		7e-148	99
GS21	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		7e-112	99
GS22	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		7e-122	99
GS23	<i>Pseudoalteromonas paragorgicola</i> KMM3548	KF784865	0.0	100
GS24	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		0.0	97
GS25	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85		0.0	97
GS26	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		4e-130	98
GS27	<i>Citricella thiooxidans</i> CHLG1	KF784866	3e-115	99
GS28	<i>Glaciacola agarilytica</i> NO2	KF784867	0.0	99
GS29	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		7e-158	98
GS30	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		1e-176	99
GS31	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		0.0	99
GS32	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		0.0	97
GS33	<i>Pseudoalteromonas nigrifaciens</i> NCIMB8614	KF784868	0.0	100
GS34	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		9e-11	99
GS35	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2	KF784869	0.0	99
GS36	<i>Halomonas shengliensis</i> SL014B-85		0.0	97

ANEXO – B: Resultados das comparações de todas as linhagens isoladas da colônia de *S. stellata* sadia com as sequências parciais do gene RNAr 16S depositadas no GenBank.

GS 37	<i>Pseudoalteromonas arctica</i> A 37-1-2		0.0	99
GS39	<i>Cobetia marina</i> DSM 4741	KF784870	0.0	98
GS40	<i>Halomonas saccharevitans</i> AJ275		2e-173	98

GS: linhagens isoladas da colônia de *S. stellata* sadia.

*: Código de acesso das sequencias depositadas no NCBI.

ANEXO – C: Resultados das comparações de todas as linhagens isoladas da colônia de *S. stellata* roxa com as sequências parciais do gene RNAr 16S depositadas no GenBank.

Linhagem	Alinhamento mais significativo	Código de Acesso	Valor E	Máxima identidade (%)
GR01	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	98
GR03	<i>Alteromonas marina</i> SW-47	KF784847*	0.0	98
GR04	<i>Thalassospira xiamenensis</i> M-5	KF784848	3e-146	97
GR05	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	99
GR06	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR07	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	KF784849	0.0	99
GR08	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR09	<i>Vibrio tubiashii</i> Milford 74	KF784850	0.0	99
GR11	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	99
GR12	<i>Pseudoalteromonas prydzensis</i> MB8-11	KF784851	0.0	98
GR14	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	97
GR15	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	KF784852	0.0	99
GR16	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	98
GR17	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR19	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	KF784853	0.0	99
GR20	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	98
GR21	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR22	<i>Vibrio sinaloensis</i> CAIM797	KF784854	8e-173	98
GR23	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR24	<i>Marinobacter aquaeolei</i> VT8	KF784855	0.0	99
GR25	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR26	<i>Pseudoalteromonas flavipulchra</i> NCIMB2033	KF784856	2e-153	98
GR27	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	99
GR29	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	97
GR30	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	99
GR31	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	97
GR32	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	99
GR33	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	97
GR35	<i>Alteromonas macleodii</i> Balearic Sea AD45	KF784857	0.0	97
GR37	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	99
GR38	<i>Vibrio rotiferianus</i> LMG21460	-	0.0	98
GR39	<i>Vibrio harveyi</i> NCIMB 1280	-	0.0	98
GR40	<i>Thalassospira profundimaris</i> WP0211	-	0.0	99

GR: linhagens isoladas da colônia de *S. stellata* roxa. *: Código de acesso das sequências depositadas no NCBI.