



ROBERTA MAYRIELLE SOUZA DA SILVA



**Diversidade de bactérias cultiváveis associadas às colônias sadias e necrosadas do
zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) dos recifes costeiros de
Carapibus, Paraíba**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

João Pessoa

2015

ROBERTA MAYRIELLE SOUZA DA SILVA

Diversidade de bactérias cultiváveis associadas às colônias sadias e necrosadas do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes costeiros de Carapibus, Paraíba

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

Co-Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Francisca da Costa Sassi

João Pessoa

2015

ROBERTA MAYRIELLE SOUZA DA SILVA

Dissertação de Mestrado avaliada em ___/ ___/ ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^ª Dr^ª Krystyna Gorlach Lira
Universidade Federal da Paraíba
Orientadora

Prof^ª Dr^ª Creusoni Figueredo dos Santos
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Externa

Prof^ª Dr^ª Naila Francis Paulo de Oliveira
Universidade Federal da Paraíba
Examinadora Interna

AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo que tem feito por mim.

Aos meus pais, pois sem eles eu não existiria.

A minha orientadora professora Dra. Krystyna Lira, pela paciência e atenção.

As minhas irmãs Renata e Rayssa, pela força e carinho.

Ao meu amor, pela força, apoio incondicional e por ter sempre acreditado em mim.

Aos meus amigos do Laboratório, em especial a Giuseppe Fernandes, pelo apoio e carinho.

Aos meus amigos do Mestrado, Rayner, Rayssa e Natalina, pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos meus amigos do curso de Farmácia – Ana Paula, Igor, Ana Silvia, Ritta e George, pela amizade verdadeira, amor, -carinho e por mais que tenhamos nos distanciado um pouco, me fazem acreditar que não importa a distância, porque a amizade supera tudo.

A meu amigo Emmanuel e Aline por estarem sempre ao meu lado e torcendo pelo meu sucesso.

A minha amiga Fafá pelo carinho, atenção e pela ajuda prestada nas minhas idas e vindas nos laboratórios nos fins de semana.

À Bento e Lilian pela força, carinho e apoio.

A secretária da Pós-Graduação, Ludmila pela atenção e apoio.

À seu Bosco e Dona Alda, pelo carinho, boas risadas e apoio técnico.

À Universidade Federal da Paraíba e ao Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO/DBM/CCEN) pelo apoio representado pela infra-estrutura e equipamentos, e a CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

As comunidades microbianas desempenham um papel fundamental na saúde do coral, e suas alterações podem levar ao aparecimento de doenças. Muitas doenças afetam os corais dos recifes em várias partes do mundo, entretanto pouco se sabe sobre os agentes patogênicos e os fatores que desencadeiam o processo patológico. Nos recifes costeiros da praia de Carapibus, Conde (Paraíba, Brasil), uma doença necrosante afeta o zoantídeo *Palythoa caribaeorum*. Em virtude disso, neste trabalho objetivou-se comparar a diversidade de bactérias cultiváveis nas amostras do tecido sadio e necrosado coletadas da colônia de *P. caribaeorum* dos recifes de Carapibus. Objetivou-se também analisar a produção de enzimas proteolíticas por bactérias isoladas. A densidade de bactérias heterotróficas totais no tecido necrosado foi maior que no tecido sadio. A análise filogenética dos isolados bacterianos realizada na base das sequências parciais do gene RNAr 16S revelou que o maior número de isolados de bactérias pertenceram a classe *Bacilli* do filo *Firmicutes* (65,2%), seguida pela classe *Gama-Proteobacteria* (34,7%) do filo *Proteobacteria*. O gênero *Bacillus* foi predominante entre os isolados do tecido sadio de *P. caribaeorum*, enquanto entre as bactérias do tecido necrosado os gêneros *Bacillus* e *Vibrio* foram dominantes. Um número maior de isolados pertencentes ao gênero *Vibrio* foi encontrado no tecido necrosado (42,1%) em relação ao tecido sadio (9,6%) de *P. caribaeorum*. Foram encontradas também as bactérias *Staphylococcus* sp. no tecido sadio, *Marinobacter* spp. e *Alteromonas* spp. no tecido necrosado. Dentre os isolados do tecido sadio de *P. caribaeorum*, apenas o gênero *Bacillus* apresentou a atividade proteolítica, enquanto os isolados proteolíticos do tecido necrosado pertenceram aos gêneros: *Bacillus*, *Vibrio*, *Alteromonas* e *Marinobacter*. Os dados obtidos sugerem que as bactérias do gênero *Vibrio* e as bactérias proteolíticas podem desempenhar um papel no desenvolvimento da doença necrosante do zoantídeo estudado.

Palavras chave: *Palythoa caribaeorum*. Bactérias cultiváveis. Necrose. Enzimas proteolíticas.

ABSTRACT

The microbial communities play a fundamental role in the health of coral and their changes can lead to the onset of disease. Many diseases affect coral reefs in several parts of the world, however, little is known about the pathogenic agents and the factors that trigger the pathological process. In coastal reefs of Carapibus Beach of Conde (Paraíba state, Brazil), a tissue necrosis affects the zoanthid *Palythoa caribaeorum*. This study aimed to compare the diversity of culturable bacteria in the samples of healthy and necrotic tissue from the *P. caribaeorum* colony collected from the Carapibus reefs. The present work aimed also to analyze the production of proteolytic enzymes by isolated bacteria. The density of total heterotrophic bacteria in the necrotic tissue was higher than in healthy tissue of *P. caribaeorum*. Phylogenetic analysis of isolated bacteria based on the partial 16S rRNA gene sequences revealed that the majority of bacterial strains belonged to the *Bacilli* class of *Firmicutes* phylum (65.2%), followed by the *Gamma Proteobacteria* class (34.7%) of *Proteobacteria* phylum. The genus *Bacillus* was dominant among the strains of healthy tissue of *P. caribaeorum*, while among the bacteria of necrotic tissue the *Bacillus* and *Vibrio* were the most abundant. The higher number of strains belonged to the *Vibrio* genus were found in necrotic tissue (42.1%) in comparison with healthy tissue (9.6%). Among bacteria from healthy tissue were found also *Staphylococcus* sp. isolate and from necrotic tissue *Marinobacter* spp. and *Alteromonas* spp. isolates. Among the isolates from healthy tissue only *Bacillus* spp. showed proteolytic activity, while proteolytic isolates from necrotic tissue belonged to the genera: *Bacillus*, *Vibrio*, *Alteromonas* and *Marinobacter*. The data suggest that bacteria of the genus *Vibrio* and proteolytic bacteria may play a role in the development of tissue necrosis of zoanthid studied.

Keywords: *Palythoa caribaeorum*. Culturable bacteria. Necrosis. Proteolytic enzymes.

LISTA DE ABREVIATURAS

RNA _r 16	–	Ácido ribonucleico da subunidade ribossomal menor
BBD	–	Blanck band disease
DNA	–	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	–	Desoxirribonucleotídeo trifosfato
EDTA	–	Ácido etilenodiaminotetraácetico
M	–	Mol
Mm	–	Milimolar
NaCl	–	Cloreto de sódio
pb	–	Pares de bases
PCR	–	Reação em cadeia da polimerase
PTX	–	Palitoxina
pH	–	Potencial hidrogeniônico
RNA	–	Ácido ribonucleico
RNAse	–	Ribonuclease
RPM	–	Rotação por minuto
UFC	–	Unidades formadoras de colônias
WS	–	White Síndrome

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. <i>Palythoa caribaeorum</i> nos recifes de Carapibus – PB	14
Figura 02. Vista aérea de recifes de corais e da Praia de Carapibus no litoral sul do município do Conde – PB. A seta aponta o local da coleta	19
Figura 03. Vista dos recifes de corais da Praia de Carapibus, Conde – PB	20
Figura 04. Fragmentos do tecido necrosado (A) e sadio (B) da colônia do zoantídeo <i>P. caribaeorum</i> nos recifes de Carapibus, Conde – PB	20
Figura 05. Colônia do zoantídeo <i>P. caribaeorum</i> acometida pela doença necrosante nos recifes de Carapibus, Conde – PB, apresentando locais afetados pela necrose (setas).	21
Figura 06. Amostras maceradas dos fragmentos do tecido necrosado (A) e sadio (B) de <i>P. caribaeorum</i> nos recifes de Carapibus, Conde – PB	22
Figura 07. Percentual dos gêneros de isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	32
Figura 08. Comparação dos gêneros das bactérias isoladas do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	33
Figura 09. Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i> isoladas do tecido sadio de <i>P. caribaeorum</i> dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB....	36
Figura 10. Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo <i>Firmicutes</i> isoladas do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	37
Figura 11. Árvore filogenética de bactérias pertencentes à classe <i>Gama-Proteobacteria</i> isoladas do tecido sadio de <i>P. caribaeorum</i> dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB.....	38
Figura 12. Árvore filogenética de bactérias pertencentes à classe <i>Gama-Proteobacteria</i> isoladas do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	39
Figura 13. Percentual dos isolados de bactérias com atividade proteolítica do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	40
Figura 14. Atividade proteolítica dos isolados da espécie <i>Bacillus pumilus</i> (PN 70- PN 73) do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Número de isolados de bactérias obtidos do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	27
Tabela 02. Identificação das bactérias isoladas do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i> dos recifes de Carapibus –PB tomando como base as análises do BLAST das sequencias de RNAr 16S	29
Tabela 03. Os gêneros dos isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	30
Tabela 04. Atividade proteolítica dos isolados de bactérias provenientes do tecido sadio de <i>P. caribaeorum</i>	41
Tabela 05. Atividade proteolítica dos isolados de bactérias provenientes do tecido necrosado de <i>P. caribaeorum</i>	42

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 OS RECIFES DE CORAIS	10
1.2 CARACTERIZAÇÃO DO FILO CNIDÁRIA	11
1.3 ZOANTÍDEOS DO GÊNERO <i>PALYTHOA</i>	12
1.4 DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS CNIDÁRIOS E SUA IMPORTÂNCIA	15
2 OBJETIVOS	18
2.1 OBJETIVOS GERAIS	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 ÁREA DE ESTUDOS E COLETA DE AMOSTRAS	19
3.2 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO TECIDO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	21
3.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	22
3.3.1 Coloração de Gram	23
3.3.2 Formação de Endósporos	23
3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	23
3.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>PALYTHOA CARIBAEORUM</i>	24
3.5.1 Extração do DNA genômico	24
3.5.2 Eletroforese e quantificação do DNA genômico	25
3.5.3 Amplificação do gene RNAr 16S e purificação dos produtos de PCR	25
3.5.4 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise filogenética das bactérias isoladas do tecido de <i>P. caribaeorum</i>	26
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	27
4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	27
4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	28
4.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS ISOLADOS DO TECIDO SADIO E NECROSADO DE <i>P. CARIBAEORUM</i>	40
5 CONCLUSÕES	45
REFERÊNCIAS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 OS RECIFES DE CORAIS

Os recifes de corais são ecossistemas de águas rasas que apresentam uma grande riqueza e abundância de espécies, formados por carbonato de cálcio, depositado por corais zooxantelados e algas coralíneas. Ocupam menos do que 0,1% da superfície da terra mas estima-se que abrigam um terço de todas as espécies marinhas conhecidas, desempenhando múltiplos papéis importantes nos ambientes tropicais marinhos (KNOWLTON, 2008).

Os recifes de corais são importantes por desempenhar várias funções no ambiente bentônico, entre eles temos as barreiras de proteção contra a ação das ondas do mar na região costeira, apresentam grande riqueza e diversidade de organismos associados, são fontes de matérias-primas com fins farmacológicos (MMA, 2003). Esses organismos apresentam também alta complexidade de substratos, sendo importantes para os organismos sésseis (DENOVARO; FRASCHETTI, 2002).

Dentre os principais organismos presentes em ambientes recifais estão macroalgas, esponjas, crustáceos, cnidários, poliquetas, planárias, moluscos, equinodermos, peixes, répteis, aves e mamíferos marinhos (SPALDING; RAVILIOUS, 2001). Embora apresentem uma grande diversidade de organismos de diferentes grupos, os principais organismos bioconstrutores dos recifes de coral são os invertebrados do Filo Cnidária, particularmente os pertencentes à classe Anthozoa e Hydrozoa. A descoberta de uma imensa diversidade de microrganismos, além de dinoflagelados endossimbiontes (zooxantelas), levou a descrição do conjunto do coral hospedeiro e diversos microrganismos (eucariontes, bactérias e arqueas) associados ao coral como holobionte (ROHWER et al., 2002; ANITHAJOTHI et al., 2013).

Os recifes de corais brasileiros, correspondem a menos de 1% dos recifes de corais do mundo, e possuem extensão de 3000 km do Maranhão até o sul da Bahia (LEÃO, 1986), sendo as formações do litoral sul do estado da Bahia as maiores e mais ricas do Brasil e de todo o Atlântico Sul Ocidental, em destaque para o complexo recifal de Abrolhos (LEÃO, 1994). Contudo, nos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, e Alagoas também há bancos recifais de formatos e dimensões variadas (LEÃO; DOMINGUEZ, 2000).

Na costa sudeste do Brasil, os recifes rochosos predominam, enquanto no Nordeste predominam os recifes de arenito (FLOETER et al., 2001). A distribuição e composição das comunidades bentônicas da costa brasileira estão fortemente correlacionadas com as variáveis ambientais e geográficas gerais (FERREIRA et al., 2004).

Os recifes de corais brasileiros representam uma área de grande importância para a biodiversidade e conservação do Oceano Atlântico devido a sua alta taxa de endemismo (cerca de 30% para corais Scleractínios e 25% de peixes), concentrados em uma área pequena de recife (5% dos recifes do Atlântico Ocidental) (MOURA, 2002). Os recifes costeiros brasileiros são cobertos principalmente por zoantídeos (FLOETER et al., 2007) e uma das espécies dominantes é *Palythoa caribaeorum* (FRANCINI-FILHO et al., 2013).

Nas últimas décadas, os recifes de coral têm experimentado declínio significativo devido à interação de vários fatores e alteração de diversas variáveis (WEIL et al., 2006), entre elas podemos citar o aquecimento global, destruição da camada de ozônio, o aumento das radiações UV, a sobrepesca, a eutrofização, as práticas de uso da terra e aumento da contaminação relacionada com as atividades humanas (HARVELL et al., 1999).

O declínio de recifes de coral vem aumentando e um fator que pode proporcionar isso é o surto de doenças que com o passar dos anos vem acometendo os recifes, causados em sua grande maioria por patógenos bacterianos (BARASH et al., 2005).

Há uma massiva degradação de ecossistemas de recifes de coral, particularmente no Oceano Atlântico, provocado em parte pelas doenças que acometem os corais e outros organismos dos recifes (FRANCINI-FILHO et al., 2013). Para a maioria das doenças conhecidas atualmente não foram ainda identificados os agentes patológicos (RICHARDSON, 1998).

1.2 CARACTERIZAÇÃO DO FILO CNIDÁRIA

O filo cnidária é um filo muito diversificado que abrange um número elevado de animais pluricelulares que incluem as anêmonas-do-mar, águas-vivas, caravelas-portuguesas, hidrozoários, corais e leques-do-mar. São conhecidas 11.000 espécies dos cnidários, a maioria marinhas e umas poucas de água doce, solitários ou coloniais (BRUSCA; BRUSCA, 2007).

A origem do termo Cnidária vem do grego *knidos* (urticante), pelo fato de todos os integrantes do grupo apresentarem cnidas, organelas dispostas de um longo filamento com substâncias tóxicas e espinhos retráteis, utilizadas para captura das presas e defesa (MARQUES; COLLINS, 2004). São animais relativamente simples, com apenas dois epitélios (epiderme e gastroderme) separados por uma camada denominada mesogléia (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001). Os membros deste filo podem se apresentar em duas formas estruturais distintas: medusa, a qual é de vida livre, e pólipo que vive fixo em

substratos (rochas, conchas), utilizando estas duas formas em sua fase reprodutiva e levando em consideração a forma dominante, este filo compõe as diferentes classes (MARQUES; COLLINS, 2004).

A classe Hydrozoa corresponde a um número elevado de espécies de cnidários. Os organismos mais estudados são a *Hydra* (polipoide) que é de água doce, a *Obelia* (medusoide e polipoide) e a caravela portuguesa -*Physalia* (medusoide e polipoide) (MARQUES; COLLINS, 2004).

Na classe Scyphozoa, seus representantes apresentam, predominantemente o estágio medusoide em seu ciclo de vida. As águas-vivas são os cifozoários mais conhecidos, incluindo o gênero *Aurelia* (ARAÚJO; BOSSOLAN, 2006).

Os organismos pertencentes à classe Cubozoa possuem a fase medusóide predominante em seu ciclo, e são representados por *Chironex fleckeeeri*, *Tamoya* e *Chiropsalmus* (ARAÚJO; BOSSOLAN, 2006).

Os organismos da classe Anthozoa são representados por octocorais e anêmonas-do-mar, a fase medusóide é ausente em seu ciclo de vida. Estes organismos apresentam um corpo cilíndrico com um anel de oito tentáculos circundando a boca, os quais são usados na captura de alimento. Um grande número de corais, conhecidos como escleractínios, desenvolve a capacidade de formar colônias e construir um esqueleto comum de carbonato de cálcio na sua base, com colônias em formato de cúpula ou formando ramificações. Os corais escleractínios caracterizam-se por apresentarem crescimento muito lento, mesmo em condições ideais, com taxas de apenas alguns milímetros por ano (SPALDING; RAVILIOUS; GREEN, 2001). Os corais normalmente apresentam em seus tecidos dinoflagelados fotossintéticos simbiotes conhecidos como zooxantelas que estão intimamente envolvidos na fisiologia do hospedeiro (BAKER, 2003). Dentro da classe Anthozoa, sub classe Hexacorallia, ordem Zoantharia, temos a família *Sphenopidae* onde está enquadrado o gênero *Palythoa*, o qual foi o objeto de estudo.

1.3 ZOANTÍDEOS DO GÊNERO *PALYTHOA*

Zoantharios são amplamente distribuídos, sendo os principais componentes bentônicos dos recifes de corais. Algumas espécies contêm substâncias químicas únicas, como palitoxina ou norzoanthamina (RAMOS; VASCONCELOS, 2010). A ordem é cosmopolita e divide-se em duas subordens, a Macrocnemina e Brachycnemina, os quais compreendem as

espécies que se desenvolvem em colônias de pólipos desprovidos de esqueleto carbonático (SINNIGER et al., 2005). Esses organismos ficam sujeitos à subida e a descida da maré podendo permanecer por muitas horas emersos. Os zoantharianos da subordem Macrocnemina estão presentes em vários habitats nas profundidades abissais de águas polares e tropicais (RYLAND et al., 2000). Além disso, muitos zoantharianos desta subordem vivem em associação com outros organismos, como por exemplo, as esponjas e os hidrozoários (SINNIGER et al., 2010), ou em conchas habitadas por caranguejos eremitas (REIMER, 2010). Por outro lado, Zoantharianos da subordem Brachycnemina habitam águas rasas subtropicais e tropicais e a maioria das espécies têm relações simbióticas com *Symbiodinium* spp (REIMER et al., 2006a).

Os zoantídeos do gênero *Palythoa* (Cnidaria: Hexacorallia) são comuns em águas rasas tropicais e subtropicais no mundo inteiro. FAUTIN (2006) apontou inicialmente 93 espécies, e como o passar dos anos, Appeltans et al., (2010) afirmaram que este gênero abrange 92 espécies. Como muitos outros zoantídeos de águas rasas, a maioria das espécies desse gênero são zooxanteladas, hospedando espécies de algas dinoflageladas endossimbióticas do gênero *Symbiodinium* (REIMER et al., 2006b). *Palythoa* spp. têm seus tentáculos dispostos em duas fileiras em torno de seu disco oral, e apresentam as incrustações de areia e detritos, equivalendo até 65% de seu peso corporal (HAYWICK; MUELLER, 1997).

Ao longo das últimas duas décadas, técnicas moleculares têm trazido uma reavaliação das espécies de zoantídeos (BURNETT et al., 1997) com isso, acrescentando novos taxons através do surgimento de novas espécies (REIMER et al., 2012).

Palythoa caribaeorum (família Sphenopidae, ordem Zoantharia, classe Anthozoa) tem ampla distribuição no Atlântico ocupando grandes extensões com baixa exposição e alta luminosidade (ACOSTA, 2001). Em recifes brasileiros as colônias de *P. caribaeorum* são bem desenvolvidas e ocupam grandes áreas (FLOETER et al., 2007). Por exemplo, em ilhas na Baía de Ilha Grande (Sudeste) *P. caribaeorum* é o organismo mais abundante, depois de macroalgas, chegando a recobrir mais de 25% do substrato (MANTELATTO et al., 2013).

A distribuição ampla e alta cobertura da *P. caribaeorum* é provavelmente o resultado de vários fatores, como a plasticidade da colônia (COSTA et al., 2011), a tolerância fisiológica, estratégias de reprodução sexuada e assexuada (ACOSTA et al., 2005), o crescimento rápido, forte capacidade competitiva (BASTIDA; BONE, 1996), e mecanismos anti-predadores. Além disso, *P. caribaeorum* produz palitoxina que juntamente com os fatores

mencionados acima, faz com que esta espécie seja um concorrente agressivo para o espaço em recifes (ACOSTA et al., 2001, MENDONÇA NETO; GAMA, 2009).

A palitoxina (PTX) possui peso molecular de 3300 daltons, e foi isolada pela primeira vez do zoantídeo *Palythoa toxica*, por Moore e Sheuer (1971). Em contraste com a maioria das citotoxinas, a PTX exerce a sua atividade extracelular alterando equilíbrio de íons nos sistemas biológicos. Exibe também um extraordinário nível de atividade citotóxica sobre uma variedade de linhagens celulares e desenvolve um amplo espectro de efeitos farmacológicos, tais como rompimento celular, a ligação da toxina ao seu receptor (HABERMANN, 1989), e a modulação de sinalização de cascatas de proteína cinase. A substância é tida como a toxina não proteica mais potente do meio marinho, age danificando a bomba de Na^+/K^+ - ATPase e provoca *in vitro* lise de diversos tipos de células (MUNDAY, 2011).

As colônias de *P. caribaeorum* (Figura 1) são de cor bronze, marrom ou marrom claro, podendo também adquirir a coloração branca depois de perderem zooxantelas (KEMP et al., 2006; AMARAL et al., 2009).

Figura 1. *Palythoa caribaeorum* nos recifes de Carapibus-PB.



Fonte: Krystyna Gorchach Lira (2014).

A superfície da colônia é coberta por um muco viscoso que, no Brasil, lhe conferiu o nome popular de “Baba-de-boi” (PÉREZ et al., 2005). O muco produzido protege a colônia do ressecamento durante a maré baixa, podendo também abrigar vários microrganismos marinhos (AINSWORTH et al., 2010). O muco de *P. caribaeorum* é utilizado na medicina

tradicional como um agente analgésico e anti-inflamatório e no tratamento de contusões e reumatismo, sendo que estas propriedades foram parcialmente comprovadas pelas pesquisas científicas (SOARES et al., 2006).

No nordeste do Brasil desde ano 2008 está sendo registrada uma doença necrosante que acomete as colônias de *P. caribaeorum* em recifes dos estados do Rio Grande do Norte, Paraíba e Pernambuco (comunicação pessoal)¹. A doença manifesta-se pelo aparecimento de manchas pretas, as quais se desenvolvem em uma ferida que apresenta tecido mole em decomposição.

1.4 DIVERSIDADE DE MICRORGANISMOS ASSOCIADOS AOS CNIDÁRIOS E SUA IMPORTÂNCIA

Nas últimas décadas vários estudos vêm ressaltando a importância das comunidades bacterianas associadas aos corais e a complexidade das relações entre microrganismos e corais, e outros organismos recifais (JENSEN et al., 2008; CHIMETTO et al., 2009). Entretanto pouco se sabe sobre os mecanismos que governam esta associação do coral com populações de microrganismos. A urgência para definir as funções da saúde da microbiota do coral está crescendo a cada ano, em virtude do rápido declínio dos recifes de coral do mundo inteiro (KREDIET et al., 2013).

As relações entre os microrganismos e coral dependem de fisiologia do hospedeiro, sua resistência a patógenos, bem como dos ciclos do carbono e enxofre (FERRIER-PAGES et al., 2000; HARVELL et al., 2010; KIMES et al., 2010). Estudos têm mostrado que mudanças no meio ambiente, como diminuição do pH ou aumento de temperatura e matéria orgânica podem refletir também na composição do coral holobionte (LITTMAN et al., 2010).

Vários fatores podem causar um desequilíbrio da relação coral-microrganismo. Entre eles podemos citar impactos antropogênicos, tais como, poluição por derramamento de óleo, contaminação por efluentes domésticos, redução na salinidade, acúmulo de sedimentos sobre os recifes (MOUCHKA et al., 2010).

Outro fator importante é aumento na temperatura da água do mar, que pode alterar diretamente a estrutura e a função das comunidades bacterianas associadas ao coral e é considerado como um dos principais fatores que desencadeia o processo das doenças de corais (HERON et al., 2010). As mudanças climáticas podem aumentar a abundância ou virulência

de patógenos (ROSENBERG; BEN-HAIM, 2002), ou a susceptibilidade de corais as doenças (AINSWORTH; HOEGH-GULDBERG, 2008).

O branqueamento do coral é a quebra da relação simbiótica entre corais e suas algas intracelulares, que conduz à perda de algas e/ou seus pigmentos fotossintéticos. Pode ser causada por uma variedade de fatores, por exemplo, metais pesados, sedimentos, patógenos (COLES-BROWN, 2003), mas é mais comumente causada pelo aumento das temperaturas da

tese das algas (HOEGH-GULDBERG, 1999;

¹ Cristiane F.C. Sassi, 2015

varios estudos tem demonstrado uma ligação entre os eventos de branqueamento e surtos posteriores de doença (GUZMAN; GUEVARA 1998; HARVELL et al., 2001; MULLER et al., 2008; BRANDT; MCMANUS, 2009).

Ao longo das últimas décadas, os ecossistemas de recifes de corais sofreram degradação a um ritmo alarmante (HUGHES et al., 2003). Esta degradação, em parte, é uma consequência dos surtos de doenças que ao longo dos tempos têm so aumentado (HARVELL et al., 2004). Existem ultimamente mais de 20 tipos de doenças que afetam os corais (ROSENBERG et al., 2007). No entanto, devido às dificuldades de isolamento e cultura, torna-se difícil identificar o agente causador (ROSENBERG et al., 2007; BOURNE et al., 2009).

Uma doença conhecida é a Black band disease (BBD), que acredita-se seja causada por um complexo de microrganismos. Recentes progressos em técnicas moleculares vem caracterizando a comunidade bacteriana associada a BBD, na qual foram encontradas as cianobactérias filamentosas, numerosas bactérias heterotróficas, bactérias sulfato redutoras e fungos (FRIAS-LOPEZ et al., 2002)

As bactérias do gênero *Vibrio* estão presentes em uma fração considerável da microbiota do muco de diferentes espécies de corais (LUNA et al., 2007). Elas pertencem à classe *Gama-Proteobacteria*, sendo importantes e ubíquas no meio marinho, compreendendo cerca de 10 % das bactérias marinhas facilmente cultiváveis (EILERS et al., 2000).

Os *Vibrios* podem viver livremente ou em associação com os animais, em relações simbióticas ou como patógenos (THOMPSON et al., 2004). Acredita-se que eles desempenhem um papel-chave na saúde dos corais (ROSENBERG et al., 2007). Por um lado, estas bactérias podem fornecer proteção contra patógenos através de substâncias químicas secretadas, ou contribuindo com a fixação de nitrogênio dentro do holobionte (RITCHIE, 2006; OLSON et al., 2009). Por outro lado, o gênero *Vibrio* apresenta várias espécies

patogênicas (*V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi*, *V. shiloi*, *V. coralliilyticus*) para corais e outros organismos marinhos (THOMPSON et al., THOMPSON et al., 2004; 2007; SUSSMAN et al., 2008; KIMES et al., 2011). Uma das mais importantes espécies patogênicas é *V. coralliilyticus*, a qual possui distribuição global, ampla gama de hospedeiros e patogenicidade dependente da temperatura (KIMES et al., 2011; TOUT et al., 2015). A espécie *Vibrio harveyi* atua como agente patogênico das doenças (necrose e white syndrome - WS) que acometem o coral *Pocillopora damicornis* (LUNA et al., 2007; LUNA et al., 2009).

Como os *Vibrios* dominam a microbiota de ambientes aquáticos com altas taxas de nutrientes e elevadas temperaturas, fatores como o aquecimento global e a poluição induzem a proliferação de vibrios potencialmente patogênicos (EILERS et al., 2000). Por exemplo, a patogenicidade da espécie *V. coralliilyticus*, isolado de organismos marinhos em várias partes do mundo, depende do aumento da temperatura (BEN-HAIM, 2002)

Com relação ao aparecimento de síndromes e doenças em zoantídeos no Brasil, e sobre microrganismos associados ao zoantídeo *Palythoa caribaeorum*, existem poucos trabalhos. Além do mais, não existem os trabalhos sobre as bactérias cultiváveis isoladas do tecido de *Palythoa caribaeorum* acometido pela necrose.

Migotto (1997) registrou um evento de branqueamento em *P. caribaeorum* no canal de São Sebastião em São Paulo-SP. Richardson (1998) apontou em seu estudo uma doença de *Palythoa caribaeorum* no litoral de São Paulo-SP causada por um patógeno desconhecido; no tecido das colônias doentes foram observadas numerosas bactérias do gênero *Vibrio* e um fungo não identificado. Acosta et al. (2001) descreveram uma doença necrosante acometendo *P. caribaeorum* do litoral norte do Estado de São Paulo, em Angra dos Reis (Rio de Janeiro) e na cidade do Recife (Pernambuco).

O Connor-Sánchez et al. (2014) observaram com base nos dados obtidos pelo pirosequenciamento que a comunidade bacteriana associada ao zoantídeo *Palythoa* sp. foi dominada pelos filos *Acidobacteria* e *Proteobacteria*. Chimetto et al. (2011) indentificou duas espécies novas de *Vibrio* (*V. variabilis* e *V. maritimus*) isoladas de tecidos da *Palythoa caribaeorum*.

Em função da escasses de trabalhos sobre diversidade de bactérias associadas ao zoantídeo *P. caribaeorum*, como também devido ao surgimento de uma doença necrosante deste zoantídeo nos recifes do litoral da Paraíba, o foco desta pesquisa foi a avaliação da diversidade de bactérias cultiváveis provenientes do tecido sadio e tecido acometido pela necrose, para apontar as possíveis espécies bacterianas envolvidas na doença necrosante.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Neste trabalho objetivou-se avaliar a diversidade de bactérias cultiváveis isoladas do tecido sadio e necrosado da colônia do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* dos recifes costeiros de Carapibus, Paraíba.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar as bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*.
- Identificar e comparar a diversidade de bactérias isoladas do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum* baseado na análise de sequencias de gene RNAr 16S.
- Analisar a produção de enzimas proteolíticas por isolados de bactérias oriundos do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*

3 MATERIAL E MÉTODOS

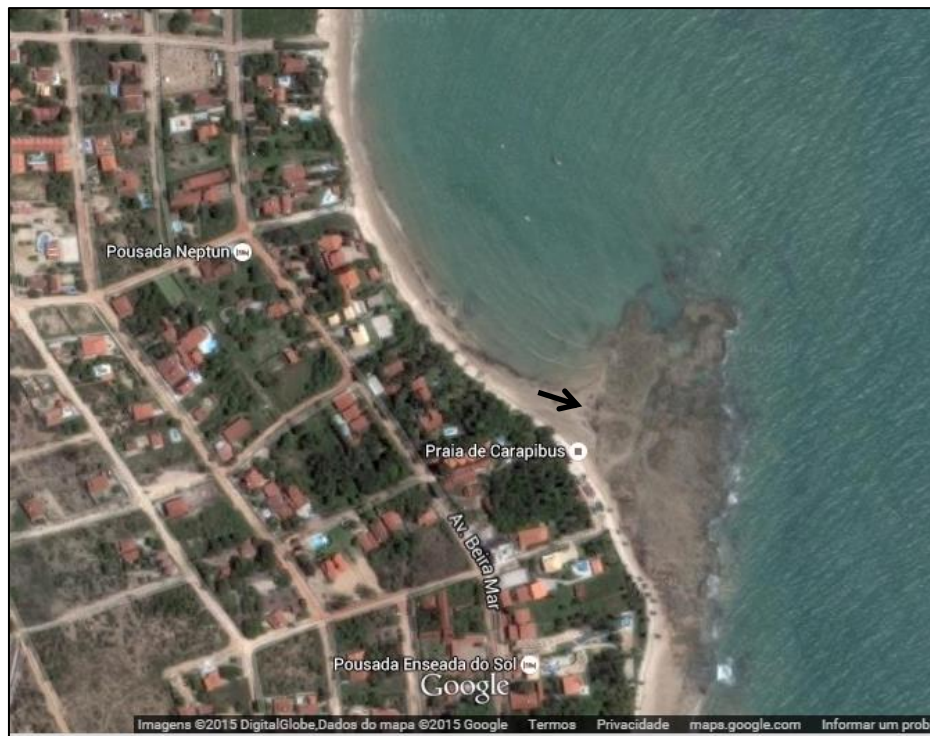
3.1 ÁREA DE ESTUDO E COLETA DE AMOSTRAS

A coleta do tecido do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing e Michelotti 1861) (família *Zoanthidae*) foi realizada em Maio de 2014 nos recifes da praia de Carapibus (7° 17' 59, 14" S x 34° 47' 45" W) localizada no litoral Sul do município do Conde, Paraíba (Figuras 2 e 3).

Foram coletados, com o auxílio de uma faca, 01 fragmento do tecido sadio (volume de 5 mL) e 01 fragmento do tecido necrosado (volume de 5 mL) (Figura 4) da colônia de *P. caribaeorum*. As amostras foram transportadas no gelo para o Laboratório de Biologia de Microrganismos (BIOMICRO/DBM/CCEN/UFPB) em frascos de vidro esterilizados, devidamente identificados, contendo água do mar filtrada estéril, e foram processadas até no máximo 12 horas após a coleta.

Figura 5 mostra uma colônia de *P. caribaeorum* acometida pela doença necrosante nos recifes de Carapibus, PB.

Figura 2. Vista aérea de recifes de corais e da Praia de Carapibus no litoral sul do município do Conde – PB. A seta aponta a localização da área da coleta de *P. caribaeorum*.



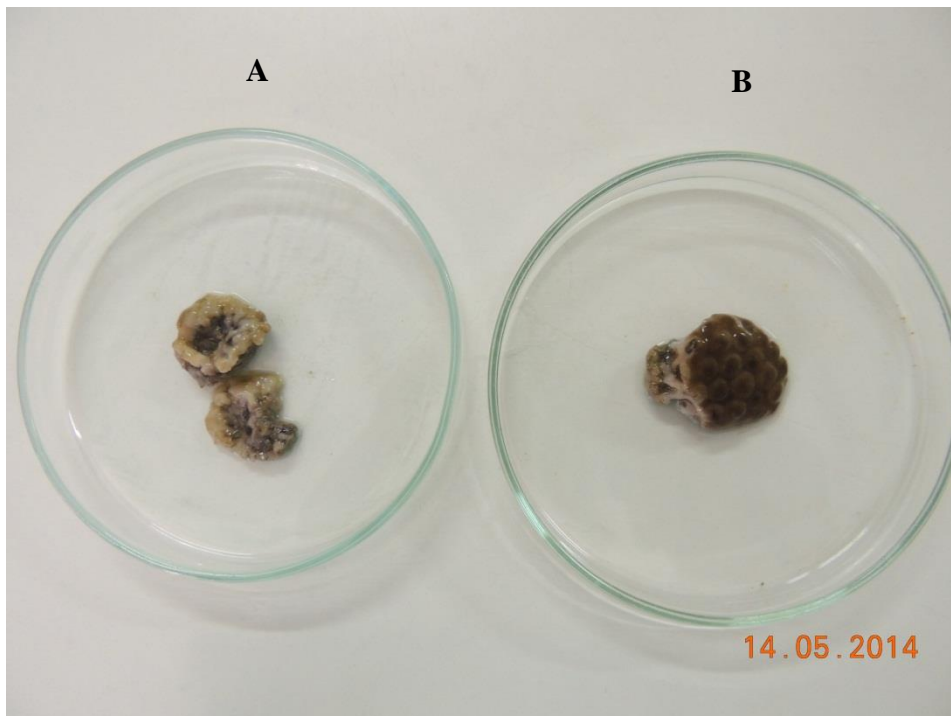
Fonte: <https://www.google.com.br/maps>; Acesso em 06 de Agosto de 2015.

Figura 3. Vista dos recifes de corais da Praia de Carapibus, Conde-PB.



Fonte: Krystyna Gorlach Lira (2014).

Figura 4. Fragmentos do tecido necrosado (A) e sadio (B) da colônia do zoantídeo *P. caribaeorum* nos recifes de Carapibus, Conde – PB.



Fonte: Krystyna Gorlach Lira (2014).

Figura 5. Colônia do zoantídeo *P. caribaeorum* acometida pela doença necrosante nos recifes de Carapibus, Conde – PB, apresentando locais afetados pela necrose (setas).



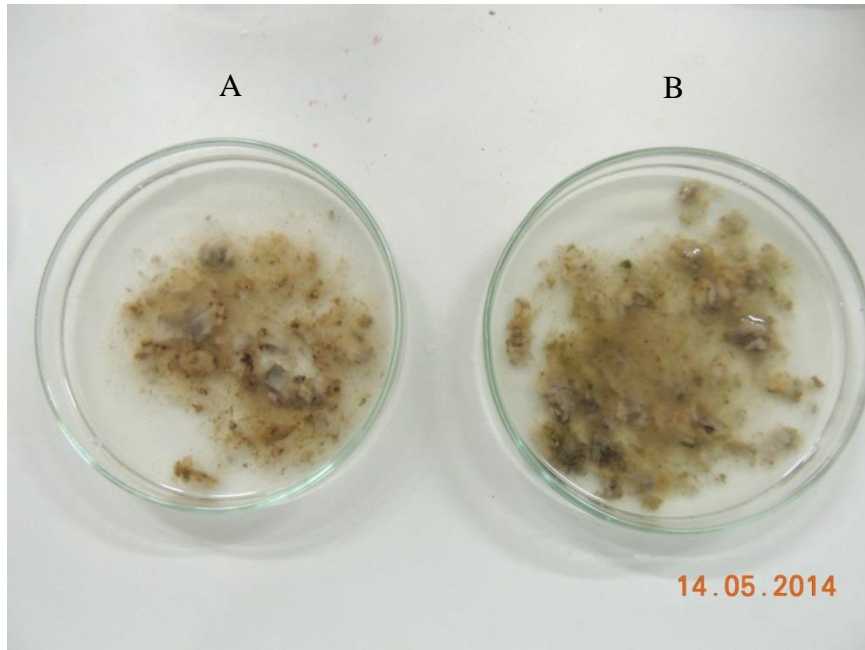
Fonte: Krystyna Gorlach Lira (2014).

3.2 CONTAGEM E ISOLAMENTO DE BACTÉRIAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*

O volume de amostra de zoantídeo foi determinado pela técnica de deslocamento de volume, utilizando uma proveta graduada contendo 60 ml de água do mar filtrada. Os fragmentos de *P. caribaeorum* foram colocados individualmente na proveta graduada e o volume deslocado foi observado e considerado como o volume total da amostra expresso em cm^3 .

O tecido do zoantídeo foi macerado no cadinho de porcelana esterilizado e, em seguida, 10mL da amostra macerada (Figura 6) foram adicionados aos 90mL de água do mar filtrada esterilizada (diluição de 10^{-1}). Em seguida as diluições decimais seriais do tecido foram preparadas utilizando 10ml da amostra da respectiva diluição e 90 mL de água do mar estéril.

Figura 6. Amostras maceradas dos fragmentos do tecido necrosado (A) e sadio (B) de *P. caribaeorum* nos recifes de Carapibus, Conde –PB.



Fonte: Krystyna Gorlach Lira (2014).

A contagem e isolamento de bactérias foram realizados no meio Agar marinho (pH 7,4) composto de 5,0g de peptona (HiMedia), 1,0g de extrato de levedura (DIFCO), 15,0g de ágar bacteriológico (KASVI), 1000mL de água do mar filtrada. As alíquotas de 1mL de cada diluição foram colocados em placas de Petri estéreis, onde foram adicionados de 15 a 20mL do meio de cultura. Após o período de incubação a 30°C por 5 dias as colônias de bactérias foram contadas, e em seguida isoladas. As contagens foram expressas em UFC (Unidades Formadoras de Colônias) cm³ da colônia do zoantídeo.

Os isolados bacterianos foram purificados no meio Agar marinho e estocados em Agar marinho semissólido e em microtubos com água destilada estéril em temperatura ambiente no escuro.

3.3 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*.

A caracterização de isolados bacterianos foi realizada através da técnica de coloração de Gram e teste de formação de endósporos.

3.3.1 Coloração de Gram

A caracterização dos isolados de bactérias foi feita por meio da coloração de Gram seguindo (GERHARDT et al., 1994). Seguiu-se a metodologia partindo da técnica de esfregaço e a fixação das amostras bacterianas em lâminas para microscopia. Após a preparação das lâminas, os esfregaços bacterianos foram submetidos ao processo de coloração com as soluções de cristal violeta (2,0 g de cristal violeta; 20 mL de etanol 95%; 0,8 g de oxalato de amônio e 80 mL água destilada) por 30 seg e solução de iodo (0,33 g de I₂; 0,66 g de KI e 100 mL de água destilada) por 1 min; descoloração com álcool 95% e re-coloração com solução de safranina (2,5 g de safranina; 100 mL de etanol 95%) por 20 seg. As observações das células de bactérias foram feitas no microscópio óptico comum LEICA ICC50 com objetiva de imersão (100x). Foi observada a morfologia e a coloração (roxa – bactérias Gram positivas; vermelha – bactérias Gram negativas) de células bacterianas.

3.3.2 Formação de endósporos

A formação de endósporos por bactérias foi analisada seguindo a metodologia de GERHARDT et al. (1994). Os isolados foram incubados por sete dias a 30° C. Após este período, uma alçada da cultura bacteriana foi transferida para tubos de eppendorf de 1,5mL, contendo 1 mL de água destilada estéril. A suspensão de células foi incubada a 80° C em banho – maria, por 15 minutos. Em seguida, 300 µL da suspensão de células foi transferida à placa de Petri, a qual o meio Ágar marinho foi adicionado. As placas foram incubadas em estufa a 30° C por 7 dias. O crescimento indicou a formação de endósporos por bactérias.

3.4 PRODUÇÃO DE ENZIMAS PROTEOLÍTICAS POR BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*.

Produção de proteases por isolados de bactérias foi determinada no meio contendo 20g de gelatina (ROYAL), 15g de agar bacteriológico (KASVI), água do mar filtrada (1000mL), pH 7,0 (SMIBERT e KRIEG, 1994). Após 3 dias de incubação das bactérias a 30°C, foi adicionada às culturas a solução de Frazier contendo 12,0 g de HgCl₂, 80 mL de água destilada e 16mL de HCl (VETEC) concentrado, segundo SMIBERT e KRIEG (1994) para

verificar a presença das proteases através da visualização de halos transparentes em torno das colônias. Os halos de hidrólise de gelatina foram medidos em mm.

3.5 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*.

3.5.1 Extração de DNA genômico

Para obter o DNA genômico total, os isolados foram cultivados em tubos contendo 10 mL de Caldo marinho (5,0g de peptona, 1,0g de extrato de levedura, 1000mL de água do mar filtrada; pH 7,4), no período de 24h – 48 horas a 30°C. As culturas foram centrifugadas a 6.000 rpm durante 10 minutos em temperatura ambiente. As células bacterianas foram ressuspensas em 1 mL de tampão TE, pH 8,0 (Tris-HCL 1M; EDTA 0,5M).

Extração de DNA genômico dos isolados bacterianos foi realizada seguindo o método de Ausubel et al. (1987) com algumas modificações. As células bacterianas foram centrifugadas a 10.000 rpm por 1 minuto à temperatura ambiente. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 540 µL de tampão TE. Após adição de 25 µL de lisosima (10mg/mL), 30µL de SDS (10%) e 2 µL de RNase (10mg/mL) a amostra foi misturada suavemente e incubada à 37° C por 1 hora. Em seguida, foram adicionados 3 µL de Proteinase K (20 mg/mL) e os microtubos foram novamente incubados à 37° C por 1 hora. Uma alíquota de 100 µL de NaCl (5M) foi adicionada e o material homogeneizado suavemente. Em seguida, para a remoção dos restos de paredes celulares, proteínas e polissacarídeos, foi adicionada uma alíquota de 80 µL de solução CTAB-NaCl pré-aquecida a 65 °C. Após a incubação a 65 °C por 10 minutos, adicionou-se aos microtubos um volume igual de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1), misturando suavemente por 5 minutos. Em seguida, o microtubo foi centrifugado a 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase superior aquosa foi transferida para um novo tubo e para a precipitação do DNA foi adicionado 0,6 do volume da amostra de álcool isopropílico gelado. As amostras foram homogeneizadas suavemente por inversão e mantidas a overnight a -20 °C e em seguida centrifugadas a 12.000 rpm por 10 min, 4 °C. Ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol gelado a 80%. Após a centrifugação da amostra (12.000 rpm, 5 min, 4 °C) o sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi submetido a secagem na estufa a 37°C no período de 30 a 40

minutos. Aos tubos contendo DNA genômico foi adicionada uma alíquota de 20-50 μL de água milli-Q estéril e as amostras foram mantidas a $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

3.5.2 Eletroforese e quantificação do DNA genômico

A qualidade das amostras de DNA foi verificada pelo método de mini gel e por espectrofotometria (SAMBROOK et al., 2012). A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 0,8% utilizando tampão Tris-borate-EDTA (TBE), 4 μL de DNA, 3 μL de tampão de corrida azul de bromofenol e 1 μL de GelRedTM (Biotium), a 80V. O gel foi fotodocumentado em transiluminador L- PIX- (Loccus Biotecnologia). As amostras de DNA foram quantificadas utilizando o aparelho NanoDrop 2000C Uv/Vis (Thermo Scientific). As concentrações de DNA foram determinadas em $\text{ng}/\mu\text{L}$ por meio da absorbância das bases no comprimento de onda de 260 nm, e o grau de pureza das amostras estabelecido pela razão dos espectros 260 nm/280nm.

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

A reação de amplificação do DNAr 16S das amostras foi realizada em aparelho termociclador (Applied Biosystems[®] 2720 Thermal Cycler) utilizando para a reação um mix padronizado, composto por 1 μL dos oligonucleotídeos universais (50 μmol) 26F (*forward*) (5'-GAG TTT GAT CMT GGC TCA G-3') e 1492R (*reverse*) (5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3') (LANE, 1991), 4 μL de DNA genômico com concentração de 50 $\text{ng}/\mu\text{L}$ e o Kit PCR Master Mix (PROMEGA) de acordo com as recomendações do fabricante. A amplificação do gene RNAr 16S foi realizada nas seguintes condições: temperatura de desnaturação inicial à $94\text{ }^\circ\text{C}$ por 5 min.; 25 ciclos de $94\text{ }^\circ\text{C}$ por 1 min., $57\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 min. e $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 2 minutos; extensão final à $72\text{ }^\circ\text{C}$ por 10 min. Realizou-se a eletroforese dos produtos da PCR em gel de agarose a 0,8% como foi descrito no item 3.5.2. A fotodocumentação do gel foi realizada no transiluminador L- PIX- (Loccus Biotecnologia) para verificar a presença da banda de 1500 pb correspondente ao gene de RNAr 16S.

A purificação das amostras foi realizada utilizando o Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System (PROMEGA), de acordo com a recomendação do fabricante.

A concentração e pureza do DNA purificado foi determinada utilizando um NanoDrop 2000C Uv/Vis (Thermo Scientific).

3.5.4 Sequenciamento do gene RNAr 16S e análise filogenética das bactérias isoladas do tecido de *P. caribaeorum*

O sequenciamento das amostras de DNA foi realizado no Laboratório de Genômica e Expressão Gênica (Plataforma de Sequenciamento de DNA), do Laboratório Central do CCB/UFPE.

As sequências de gene RNAr 16S geradas foram analisadas usando BioEdit 7.19 e comparadas com os dados no banco de sequências 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/>). As sequências com mais de 97% de similaridade foram consideradas válidas. O alinhamento múltiplo das sequências e a construção da árvore filogenética foram realizados através do programa MEGA versão 6 (TAMURA et al., 2013).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*

Apesar da ampla distribuição geográfica de *P. caribaeorum*, pouco se sabe a respeito da microbiota associada a seu tecido. Neste trabalho pela primeira vez foi avaliada a densidade de bactérias heterotróficas no tecido sadio e necrosado desse zoantídeo.

O tecido necrosado da colônia de *P. caribaeorum* apresentou número maior de bactérias heterotróficas totais do que o tecido sadio. A contagem de bactérias no tecido das colônias sadia e necrosada foi de $9,0 \times 10^3$ UFC/cm³ e $5,1 \times 10^5$ UFC/cm³, respectivamente.

Há alguns estudos em relação a outros tipos de corais no Brasil, como por exemplo, o de Araújo et al. (2015) que avaliou a densidade de bactérias heterotróficas no tecido sadio e roxo do coral *Siderastrea stellata* e verificou maior número de bactérias no tecido roxo em relação ao tecido sadio. Sussman et al. (2008) observaram maior densidade de bactérias cultiváveis presentes nas colônias afetadas pela doença White Syndrome (WS) dos corais *Pachyseris speciosa* e *Montipora aequituberculata* dos recifes no Oceano Indo-Pacífico em comparação com as colônias sadias.

Neste trabalho foram isoladas 69 linhagens de bactérias do tecido de *P. caribaeorum*, sendo que 31 linhagens foram obtidas do tecido sadio e 38 do necrosado (Tabela 1). Dentre os isolados da colônia sadia, 28 foram Gram positivos e 3 Gram negativos. Os isolados obtidos da colônia necrosada foram representados por 17 Gram positivos e 21 Gram negativos. Entre todos os isolados, 49 apresentaram a capacidade de formar endósporos.

Tabela 1. Número de isolados de bactérias obtidos do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*

Amostra	Número de isolados		
	Gram positivos	Gram negativos	Total
Tecido sadio	28	3	31
Tecido necrosado	17	21	38
Total	45	24	69

4.2 ANÁLISE FILOGENÉTICA DE BACTÉRIAS ISOLADAS DO TECIDO DE *P. CARIBAEORUM*

As amostras do DNA genômico extraídas dos isolados bacterianos apresentaram a concentração entre 56ng/μL e 2528ng/μL e um alto grau de pureza (OD₂₆₀₋₂₈₀ entre 1,8 e 2,0). Todos os isolados foram positivos quanto à amplificação do gene RNAr 16S, apresentando o produto de PCR com 1500pb.

Análise filogenética dos isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum* realizada com base nas sequências parciais de RNAr 16S revelou que as bactérias analisadas exibiram uma similaridade igual ou maior que 98% com as sequências de bactérias depositadas no GenBank (Tabela 2).

Os isolados de bactérias pertenceram a dois filos: *Firmicutes* com 65,2% dos isolados e *Proteobacteria* com 34,8%. O filo *Firmicutes* foi representado pela classe *Bacilli*, com isolados pertencentes a duas famílias (*Bacillaceae* e *Staphylococcaceae*) e 2 gêneros (*Bacillus* e *Staphylococcus*) (Tabela 3).

O filo *Proteobacteria* foi representado por bactérias da classe *Gama-proteobacteria*, distribuídos em 2 famílias (*Alteromonadaceae* e *Vibrionaceae*) e 3 gêneros (*Vibrio*, *Alteromonas* e *Marinobacter*) (Tabela 3).

Tabela 2. Identificação das bactérias isoladas do tecido sadio (PS) e necrosado (PN) de *P. caribaeorum* dos recifes de Carapibus –PB tomando como base as análises do BLAST das sequências de RNAr 16S.

Isolado	Alinhamento mais significativo e similaridade com a sequência do gene RNAr 16S código de acesso
PS 11	<i>Vibrio campbellii</i> NR 119050.1 - 100% <i>Vibrio harveyi</i> NR 102976.1 - 99%
PS39	<i>Vibrio natriegens</i> NR 117890.1 - 100%
PS 41	<i>Vibrio alginolyticus</i> NR 122059.1 - 100%
PN5, PN19	<i>Vibrio alginolyticus</i> NR118258.1 - 99% <i>Vibrio parahaemolyticus</i> NR074196.1 99%
PN28	<i>Vibrio hepatarius</i> NR 025491.1 - 99%
PN48	<i>Vibrio owensii</i> NR 117424.1 - 99%
PN49	<i>Vibrio proteolyticus</i> 118095.1 - 100%
PN13, PN18, PN23, PN25, PN27, PN31, PN35, PN39, PN46, PN47, PN50	<i>Vibrio proteolyticus</i> NR 118095.1 - 99% <i>Vibrio vulnificus</i> NR 118570.1 - 99%
PN12, PN 37, PN43, PN51	<i>Alteromonas macleodii</i> NR 074797.1 - 99% <i>Alteromonas simiduii</i> NR 043978.1 -98%
PN6	<i>Marinobacter santoriniensis</i> NR EU496088.1 - 99%
PS1, PS2, PS3, PS4, PS5, PS10, PS17, PS30, PS32, PS34, PS35, PS36, PS37, PS42, PS43, PS44, PS45, PS46, PS47, PS56, PS58, PS59, PS63, PS65, PS66, PS86, PS91	<i>Bacillus aerius</i> NR118439.1 - 100% <i>Bacillus stratosphericus</i> NR042336.1 - 100%
PN40, PN70, PN71, PN72, PN73, PN74, PN75, PN77, PN79, PN82, PN85, PN92, PN94, PN95, PN96, PN99	<i>Bacillus pumilus</i> NR 04324.1 - 99% <i>Bacillus safensis</i> NR 113945.1 - 99%
PN87	<i>Bacillus aerius</i> 118439.1 - 100% <i>Bacillus stratosphericus</i> NR 042336.1 - 99%
PS19	<i>Staphylococcus aureus</i> NR115606.1 - 100% <i>Staphylococcus simiae</i> NR 043146.1 - 99%

Tabela 3. Os gêneros dos isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*.

Filo/Classe Família/Gênero	Número de isolados		
	Tecido sadio	Tecido necrosado	Total
<i>Proteobacteria/Gama-Proteobacteria/</i>			
<i>Vibrionaceae/Vibrio</i>	3	16	19
<i>Alteromonadaceae/Alteromonas</i>	0	4	4
<i>Alteromonadaceae/Marinobacter</i>	0	1	1
<i>Firmicutes/Bacilli</i>			
<i>Bacillaceae/Staphylococcus</i>	1	0	1
<i>Bacillaceae/Bacillus</i>	27	17	44

No nosso trabalho o filo *Firmicutes* foi representado por maior número de isolados entre as bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*. Outros trabalhos também relataram esse filo como um dos dominantes entre as bactérias associadas a algumas espécies de corais. Nithyanand e Pandian (2009) observaram que a maioria dos isolados bacterianos obtidos do muco e do tecido do coral *Acropora digitifera* pertenceram ao filo *Firmicutes*. Kuek et al. (2015) pesquisaram a distribuição de bactérias cultiváveis no muco de corais dos recifes Talang-Talang na Malásia e encontraram um número bastante significativo de bactérias do filo *Firmicutes*, sendo que os isolados pertencentes a classe *Gama-Proteobacteria* foram dominantes.

Um estudo sobre a composição da comunidade bacteriana do coral *Orbicella annularis* sadio e doente mostrou maior abundância do filo *Firmicutes* no coral sadio em relação ao coral doente com base nos dados obtidos com a técnica de microarranjo de DNA (KELLOG et al., 2013). Os dados do nosso trabalho revelaram também que o número de isolados pertencentes ao filo *Firmicutes* no tecido sadio foi maior que no tecido necrosado de *P. caribaeorum*.

Diferentemente dos dados obtidos no nosso trabalho, Campos (2011), avaliando a diversidade de bactérias cultiváveis associadas ao muco de colônias saudáveis e branqueadas do zoantídeo *P. caribaeorum* no litoral de Pernambuco, observou que o filo mais abundante foi o *Proteobacteria* (as classes *Gama-Proteobacteria* e *Alfa-Proteobacteria*), seguido pelos filios de *Actinobacteria* e *Firmicutes*.

Carlos et al., (2013) também constataram que a classe de bactérias Gram-negativas *Gama-Proteobacteria* dominou a comunidade microbiana do muco de *P. caribaeorum* presente no canal de São Sebastião- SP, o filo *Proteobacteria* foi o mais significativo dentre

os filos identificados. Rabelo (2012) mostrou também que o filo *Proteobacteria* predominava entre as bactérias associadas ao zoantídeo *P. caribaeorum*, sendo que a classe *Gama-Proteobacteria* foi a mais abundante.

Shnit-Orland e Kushmaro (2009) isolaram bactérias do muco de seis corais duros e dois corais moles no golfo do Eilat com intuito de conhecer a capacidade de produção de antibióticos e constataram que 89,5% dos gêneros bacterianos apresentaram atividade antimicrobiana e que pertenciam à classe *Gama-Proteobacteria*, o que pode estar relacionado ao papel de defesa contra patógenos.

Chimetto et al. (2008) isolaram as bactérias associadas ao muco do coral *Mussismilia hispida* e de zoantídeos *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* e *Zoanthus solanderi* da região de São Sebastião-SP e concluíram que a maioria dos isolados obtidos pertenciam à classe *Gama-Proteobacteria*, sendo que mais da metade foram identificados como *Vibrio* spp. com base em sequências parciais do gene rRNA16S.

Pela primeira vez, através de técnicas de pirosequenciamento, Sun et al. (2014) analisaram a comunidade microbiana associada ao zoantídeo *Palythoa australiae*, e verificou que o filo *Proteobacteria* foi o mais abundante em um total de 16 filos.

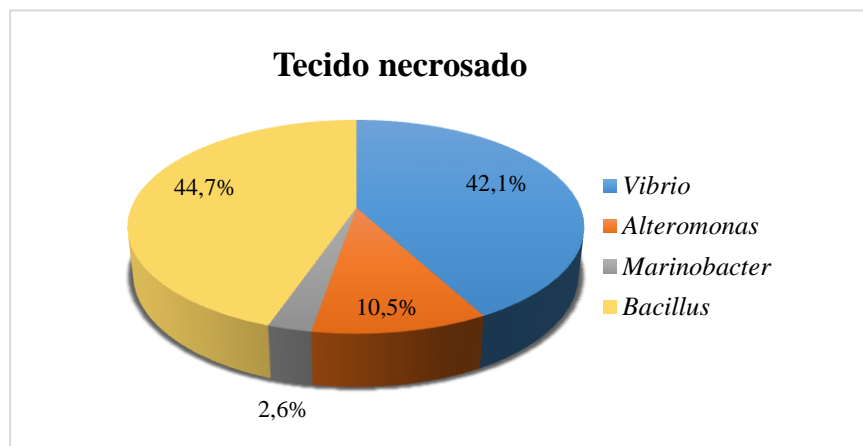
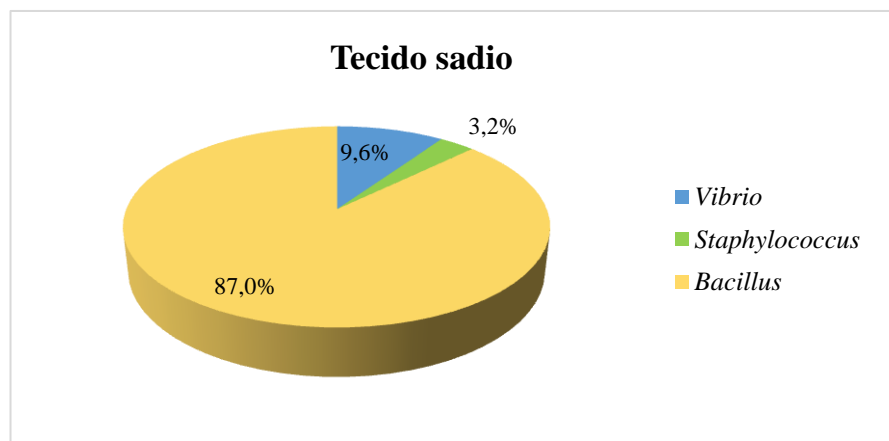
Existem alguns estudos sobre a diversidade de microrganismos associados aos corais sadios e doentes realizados no Brasil. Reis et al. (2009), observaram diferenças nas comunidades associadas a colônias sadias e doentes do coral brasileiro *Mussismilia brasiliensis* nos recifes de Abrolhos, sugerindo que bactérias oportunistas colonizaram o coral doente. Este estudo foi importante por ter sido o pioneiro sobre a microbiota deste coral. Araújo (2013) isolou bactérias do tecido de colônias sadias e roxas do coral *S. stellata* do litoral Paraibano e verificou a predominância da classe *Gama-Proteobacteria* (83%), seguido pela classe *Alfa-Proteobacteria* (17%) pertencentes ao filo *Proteobacteria*.

No presente estudo, dos cinco gêneros registrados entre os isolados bacterianos analisados, o gênero *Bacillus* apresentou maior número (63,8%), seguido pelo gênero *Vibrio* (27,5%), *Alteromonas* (5,8%), *Marinobacter* (1,4%) e *Staphylococcus* (1,4%).

Entre as linhagens de bactérias isoladas do tecido sadio de *P. caribaeorum*, 87% pertenceram ao gênero *Bacillus*, 9,6 % ao gênero *Vibrio* e em menor proporção o gênero *Staphylococcus* com 3,2% (Figura 7). Os gêneros *Bacillus* e *Vibrio* também foram encontrados no tecido necrosado do zoantídeo, correspondendo a 44,7% e 42,1%, respectivamente. (Figura 7).

Dois gêneros foram exclusivos para os isolados do tecido necrosado de *P. caribaeorum*, o gênero *Alteromonas* representado por 10,5% de isolados e o gênero *Marinobacter* com 2,6% dos isolados (Figuras 7 e 8).

Figura 7. Percentual dos gêneros de isolados de bactérias do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*.



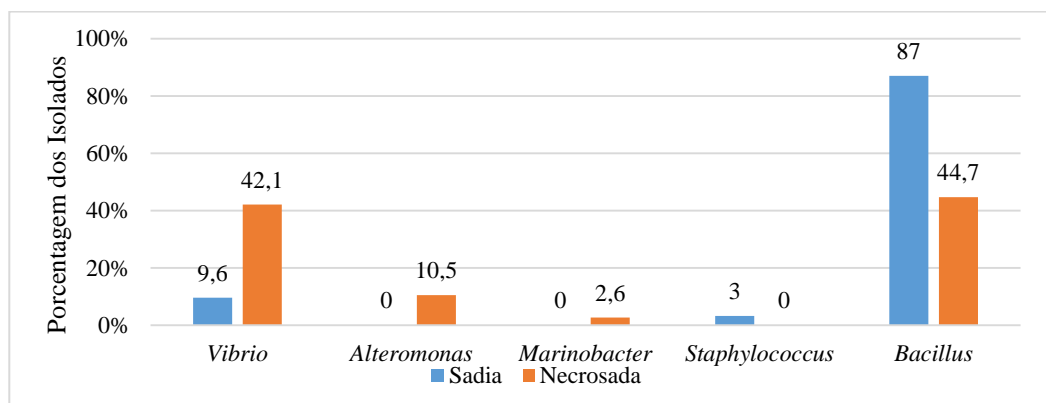
O gênero *Bacillus* foi representado por um maior número de isolados, tanto no tecido sadio (87%) quanto no necrosado (44,7%) (Figuras 7 e 8).

Todos os isolados obtidos do tecido sadio de *P. caribaeorum* pertencentes a esse gênero apresentaram 100% de similaridade com as espécies *Bacillus aerius* e *Bacillus stratosphericus* (Tabela 2 e Figura 9).

Kellog et al. (2013) compararam a composição da comunidade bacteriana do coral *Orbicella annularis* do Parque Nacional de Tortugas e das Ilhas Virgens. Eles encontraram maior abundância do gênero *Bacillus* no coral sadio comparado com o coral afetado pela doença da white plague. No nosso trabalho o gênero *Bacillus* também foi mais frequente entre os isolados do tecido sadio de *P. caribaeorum*.

O gênero *Bacillus* é um grupo heterogêneo de bactérias anaeróbicas ou aeróbicas facultativas, em forma de bastonetes Gram-positivas, formadoras de endósporos, com ampla distribuição em vários ambientes. Na realidade, em comparação com espécies encontradas nos ambientes terrestres, pouco se sabe sobre sua distribuição e ecologia em ecossistemas marinhos (CONNOR et al., 2010).

Figura 8. Comparação dos gêneros das bactérias isoladas do tecido sadio e necrosado de *P. caribaeorum*.



No nosso trabalho foi observado que quase todos os isolados provenientes do tecido necrosado para o gênero *Bacillus* apresentaram similaridade de 99% com as espécies *B. safensis* e *B. pumilus* (Tabela 2 e Figura 10).

A espécie *Bacillus pumillus* encontrado neste trabalho no tecido necrosado de *P. caribaeorum*, também foi identificada no muco dos corais *Pennatula phosphorea* e *Pteroeides spinosum* do Mar Mediterrâneo e demonstrou atividade bacteriana contra *Staphylococcus aureus* (PORPORATO et al., 2013).

Uma hipótese a ser levantada para o gênero *Bacillus* se apresentar em maior número no tecido sadio em relação ao tecido necrosado de *P. caribaeorum*, é que estas bactérias podem desempenhar um papel de proteção no coral hospedeiro. Alguns dados mostram que *Bacillus* spp. presentes no muco de corais apresentam atividade antibacteriana contra

patógenos (SHNIT-ORLAND; KUSHMARO, 2009). Dentro da classe *Firmicutes*, os isolados do gênero *Bacillus* em particular se caracterizam pela produção de compostos antibacterianos (WIESE et al., 2009).

No nosso trabalho nota-se que o gênero *Vibrio* teve destaque no tecido necrosado da *P. caribaeorum* (42% dos isolados) em relação ao tecido sadio (9,6%) (Figura 8).

Dentre os isolados do gênero *Vibrio* do tecido sadio foram observadas as espécies *Vibrio campbellii*, *Vibrio rotiferianus* e *Vibrio alginolyticus* com 100% de similaridade (Tabela 2 e Figura 11) enquanto os isolados do tecido necrosado foram representados pelas espécies *Vibrio proteolyticus*, *Vibrio hepatarius* e *Vibrio parahaemolyticus*, e *Vibrio owensii*, com similaridade de 99% (Tabela 2 e Figura 12).

Vários estudos relatam maior incidência desse grupo de bactérias nos corais podendo favorecer o aparecimento de doenças (FRYDENBORG et al., 2014). Todos os membros do gênero *Vibrio* são Gram-negativos, aeróbios facultativos, em forma de bastonetes, e ligeiramente encurvados, encontrados em ambientes marinhos. Este gênero é conhecido por algumas espécies que causam doenças em corais e por serem virulentos dependendo da temperatura (FRYDENBORG, 2014). Estudos utilizando a análise de metagenômica nos corais dos recifes do Caribe e do Indo-Pacífico realizados por Cervino et al. (2008) mostrou que 71% dos isolados presentes no tecido afetado pela YBD (yellow band disease) pertenciam ao gênero dos *Vibrios*, destacando as mesmas espécies encontradas no tecido necrosado do *P. caribaeorum* como o *Vibrio proteolyticus*.

Avaliando a diversidade do gênero *Vibrio* nos corais *Mussimilia hispida* e *P. caribaeorum* no litoral do Brasil, Chimetto et al. (2009) identificaram a presença de *Vibrio alginolyticus* e *Vibrio campbellii* em ambos os corais.

As pesquisas sobre o coral *Montipora capitata* em relação aos surtos de WS (White Syndrome) no Havaí, identificaram pela primeira vez o *Vibrio owensii* como patógeno desta doença nesta região (USHIJIMA et al., 2012). Em outro estudo, um isolado do coral *Styphora* sp. apresentou 99% de similaridade com o *V. campbellii*, de acordo com o sequenciamento de gene RNAr 16S (SHNIT-ORLAND; KUSHMARO, 2009).

Apesar dos fatos que indicam a patogenicidade de várias espécies de *Vibrio*, este gênero desempenha também funções importantes para os corais fornecendo os nutrientes e metabólitos secundários, como por exemplo bacteriocinas, para seus hospedeiros (SHNIT-ORLAND; KUSHMARO, 2009). Por exemplo, a espécie *V. alginolyticus*, a qual foi encontrado neste trabalho no tecido sadio de *P. caribaeorum*, pode exercer relações

mutualísticas importantes com os corais, sendo boas fixadoras de nitrogênio (RITCHIE, 2006). O processo de fixação de nitrogênio pode estar relacionado com a desnitrificação mediada pelos organismos presentes no muco dos corais (CHIMETTO et al. 2008).

Por outro lado, o *Vibrio alginolyticus* foi identificado pela primeira vez como patógeno da doença White Syndrome do coral *Porites andrewsi*, no mar da China (ZHENYU et al., 2013) e também como patógeno da doença Yellow Band disease do coral *Diploastrea heliopora* do mar do Caribe e Oceano Indo-Pacífico (CERVINO et al., 2008).

Diante dessas observações é importante ressaltar, que dependendo de fatores como temperatura, estado imunológico do hospedeiro, as espécies do gênero *Vibrio* podem estabelecer relações positivas ou negativas com os corais (CERVINO et al., 2008; CHIMETTO et al., 2008)

No nosso trabalho, dentre as bactérias do tecido sadio de *P. caribaeorum* foi encontrado um isolado de *Staphylococcus* sp., o qual apresentou similaridade com *S. aureus* (100%) e *S. simiae* (99%) (Tabela 2 e Figura 9).

O gênero *Staphylococcus* também foi encontrado por Menezes et al. (2010) entre as bactérias associadas às ascídias e esponjas no Norte da costa do estado de São Paulo. Hong et al. (2009) também observaram a presença desse gênero de bactérias no coral *Stylophora pistillata* em Taiwan.

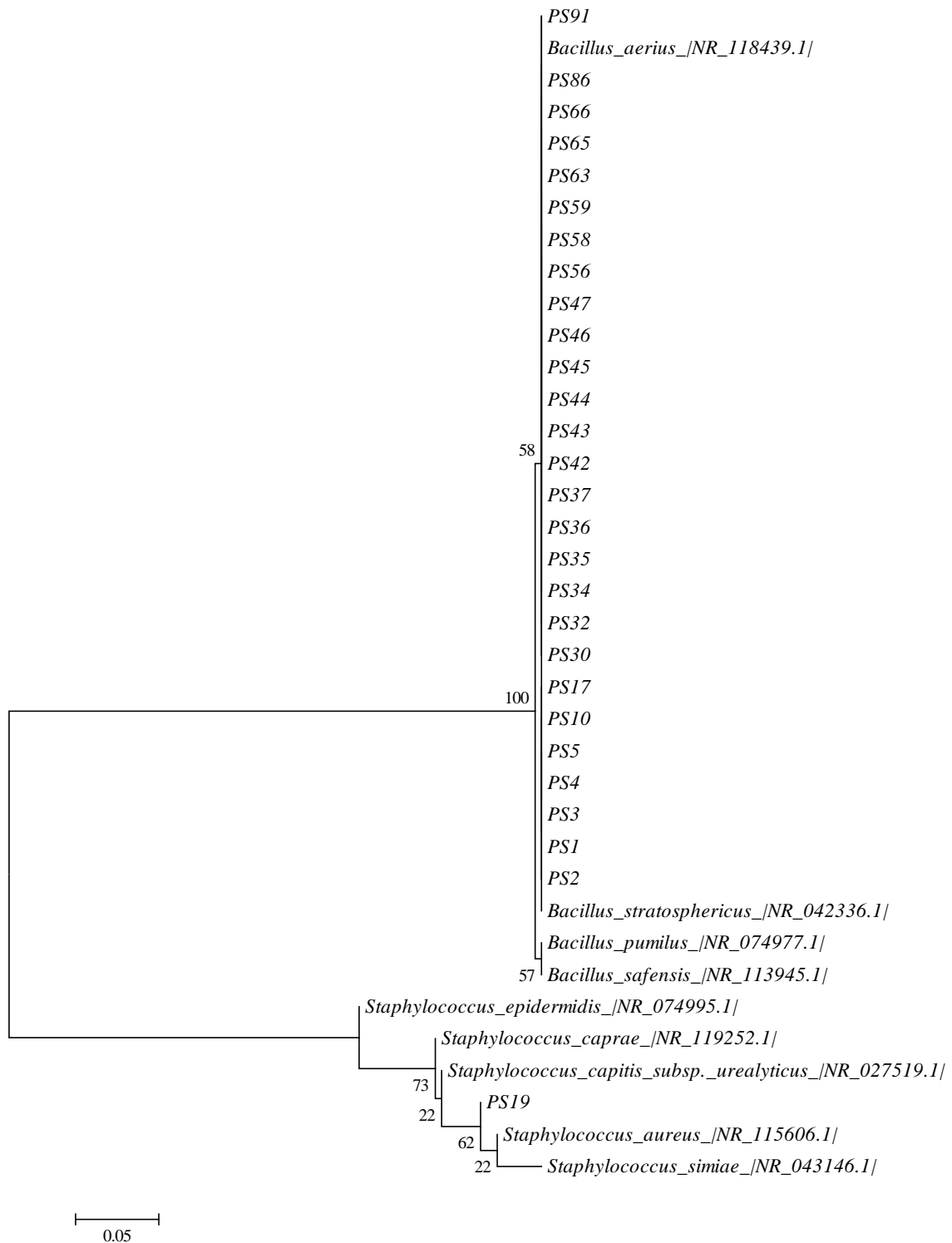


Figura 9. Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* isoladas do tecido sadio de *P. caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB, e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de rRNA 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2. Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 replicas. Os números de acesso das sequencias do GenBank são mostradas em parênteses.

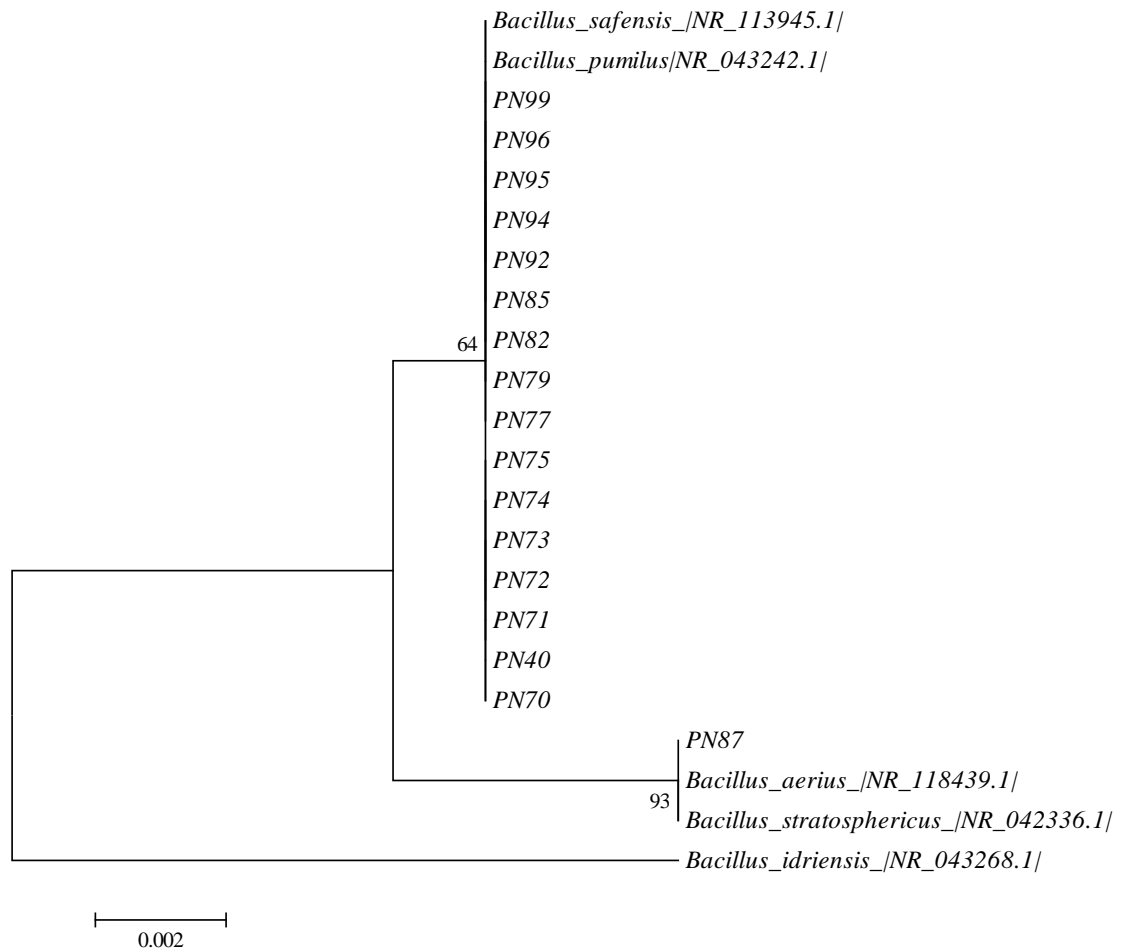


Figura 10. Árvore filogenética de bactérias pertencentes ao filo *Firmicutes* isoladas do tecido necrosado de *P. caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB, e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2. Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 replicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostradas em parênteses.

Os 4 isolados do gênero *Alteromonas* que foram exclusivos para o tecido necrosado, apresentaram similaridade de 99% com *Alteromonas macleodii* (Tabela 2 e Figura 12). Esse gênero pertence ao filo das *Proteobacterias* e abrange as bactérias Gram negativas, com formas retas ou encurvadas, as quais se movem por meio de um único flagelo polar. Os membros desse gênero são encontrados em águas costeiras e em mar aberto (BAUMAN et al., 1972; BOURNE; MUNN, 2005).

Nos recifes costeiros da Paraíba, Araújo (2013) identificou a presença do gênero *Alteromonas* em bactérias isoladas das colônias roxas do coral *S. stellata*. Isolados pertencentes a este gênero também foram encontrados em tecidos lesionados do coral *Stephanocoenia intersepta* com a doença da Dark Spot Syndrome, no Caribe (SWEET et al.,

2013). A espécie *A. macleodii*, encontrada no nosso estudo, foi identificada no muco do coral *Fungia* sp. dos recifes da costa do Mar Vermelho (ALLERS, 2008).

Outro gênero encontrado neste trabalho apenas no tecido necrosado de *P. caribaeorum* foi *Marinobacter*, sendo que foi obtido um isolado que apresentou similaridade de 99% com a espécie *Marinobacter santoriniensis* (Tabela 2 e Figura 12). As bactérias do gênero *Marinobacter* são frequentemente encontradas em ecossistemas marinhos profundos, habitando águas frias e quentes (KAYE et al., 2011).

Carlos et al. (2013) avaliaram a diversidade de bactérias heterotróficas presentes no muco de *P. caribaeorum* na costa do Sudeste do Brasil, e constataram a presença do gênero *Marinobacter* no muco deste zoantídeo.

Alex et al. (2013) relataram a presença deste gênero de bactérias no tecido da desmoesponja *Polymastia penicillus* nos recifes de corais na costa do Atlântico de Portugal.

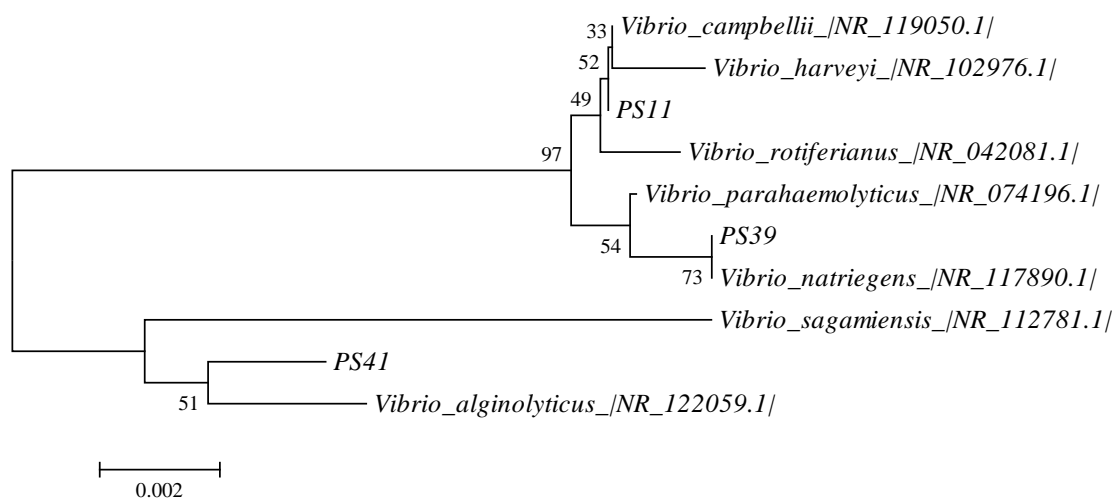


Figura 11 Árvore filogenética de bactérias pertencentes à classe *Gama-Proteobacteria* isoladas do tecido sadio de *P. caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB, e linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2. Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 replicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostradas em parênteses.

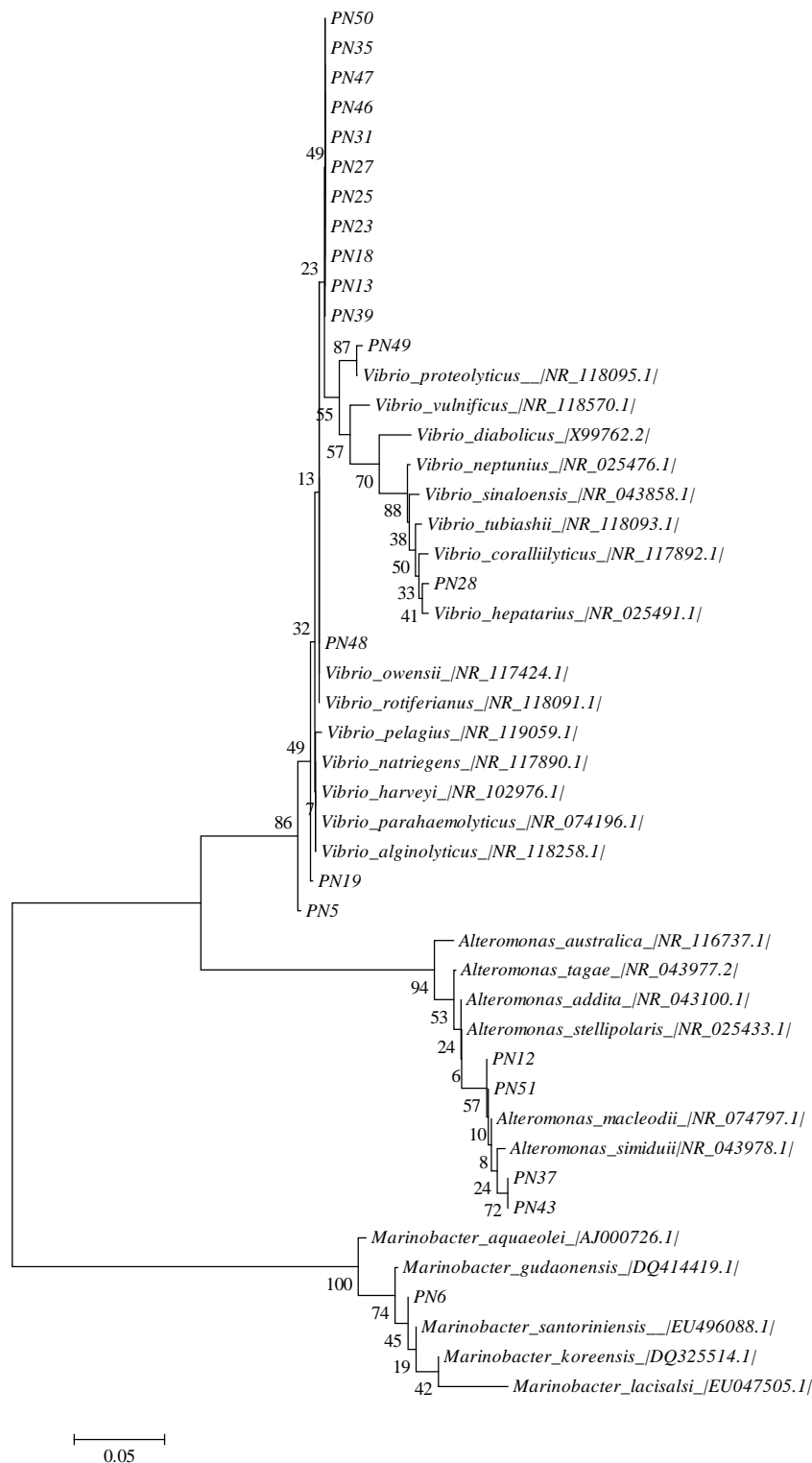


Figura 12. Árvore filogenética de bactérias pertencentes à classe *Gama-Proteobacteria* isoladas do tecido necrosado de *P. caribaeorum* dos recifes de corais de Carapibus, João Pessoa-PB, e de linhagens de bactérias do GenBank baseada na comparação das sequências de RNAr 16S utilizando análise *neighbour-joining* e o modelo Kimura 2. Os valores de *bootstrap* mostradas na árvore foram obtidos com base de 1.000 replicas. Os números de acesso das sequências do GenBank são mostradas em parênteses.

4.3 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA DOS ISOLADOS DO TECIDO SADIO E NECROSADO DE *P. CARIBAEORUM*

Dentre as bactérias do tecido sadio de *P. caribaeorum*, todos os isolados do gênero *Bacillus* apresentaram a atividade proteolítica (Figura 13 e Tabela 4). O isolado PS91 foi o que apresentou o maior halo de degradação (28 mm).

Dentre os isolados bacterianos do tecido necrosado de *P. caribaeorum* foram observadas bactérias proteolíticas nos 4 gêneros: *Bacillus* (17 isolados), *Vibrio* (5 isolados), *Alteromonas* (4 isolados) e *Marinobacter* (1 isolado) (Figura 13.).

Figura 13. Percentual dos isolados de bactérias com atividade proteolítica do tecido sadio e necrosado da *P. caribaeorum*.

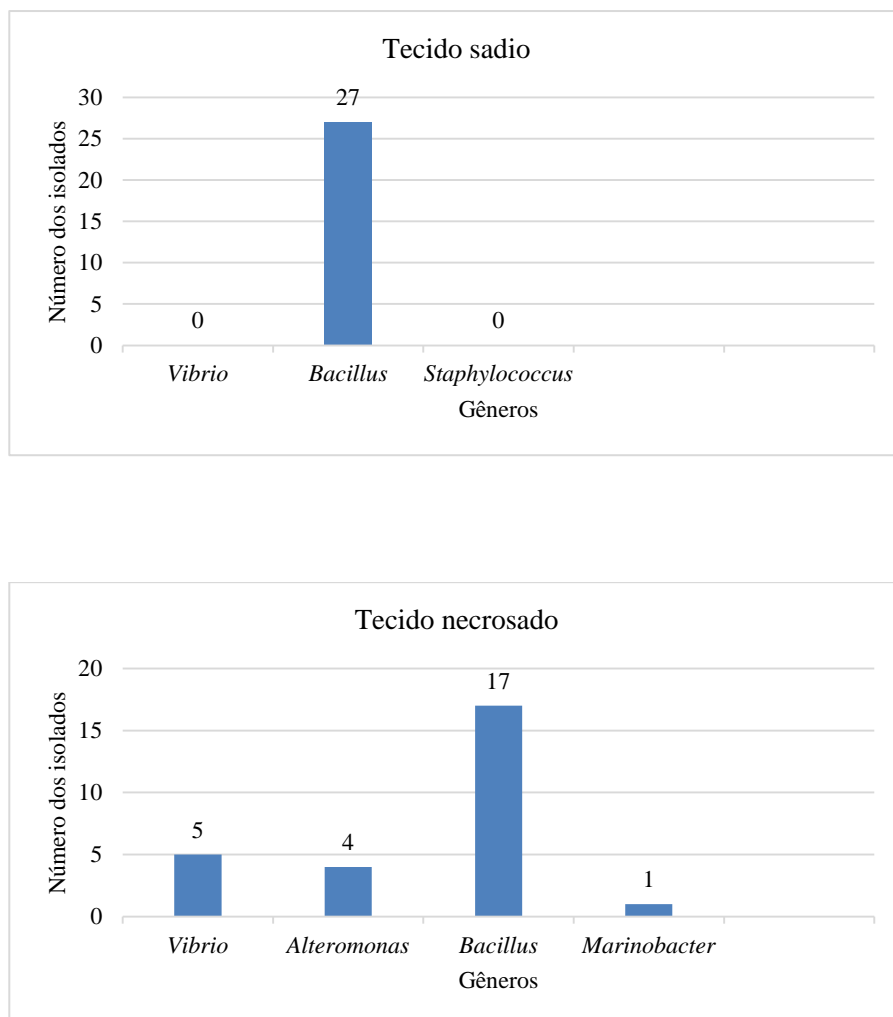


Tabela 4. Atividade proteolítica dos isolados de bactérias provenientes do tecido sadio de *P. caribaeorum*.

Gênero	Isolados	Diâmetro do halo (mm)
<i>Vibrio</i>	PS11	0
	PS39	0
	PS41	0
<i>Staphylococcus</i>	PS19	0
<i>Bacillus</i>	PS1	7
	PS2	10
	PS3	12
	PS4	14
	PS5	12
	PS10	10
	PS17	13
	PS30	14
	PS32	15
	PS34	10
	PS35	13
	PS36	13
	PS37	12
	PS42	26
	PS43	17
	PS44	21
	PS45	24
	PS46	14
	PS47	15
	PS56	18
	PS58	18
	PS59	20
	PS63	20
PS65	18	
PS66	12	
PS86	15	
PS91	28	

Os isolados com maior atividade proteolítica encontrados no tecido necrosado de *P. caribaeorum* foram o PN74 (*Bacillus pumillus*) com halo de 46 mm e PN 49 (*Vibrio proteolyticus*) com halo de 40 mm (Tabela 5).

Entre os isolados proteolíticos pertencentes ao gênero *Vibrio*, foram encontrados: *V. proteolyticus* (PN 39, PN 46, PN 49, PN50) e *V. natriegens* (PN 48) (Tabela 5). Para o gênero *Alteromonas* todos os 4 isolados apresentaram atividade proteolítica, sendo representados pela espécie *A. macleodii*, destacando-se o isolado PN43 com halo de degradação de 36 mm (Tabela 5).

Tabela 5. Atividade proteolítica dos isolados de bactérias provenientes do tecido necrosado de *P. caribaeorum*.

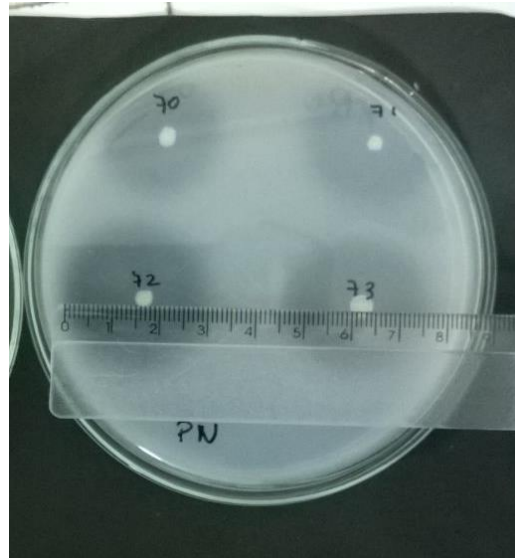
Gênero	Isolados	Diâmetro do halo (mm)
<i>Vibrio</i>	PN5	0
	PN39	27
	PN46	16
	PN47	0
	PN48	7
	PN49	40
	PN50	26
<i>Alteromonas</i>	PN12	27
	PN37	26
	PN43	36
	PN51	23
<i>Marinobacter</i>	PN6	27
	PN40	15
	PN70	26
	PN71	28
	PN72	32
	PN73	29
	PN74	46
	PN75	33
	PN77	33
	PN79	37
	PN82	38
	PN85	33
	PN87	22
	PN90	26
	PN92	20
	PN94	20
	PN95	25
PN96	25	
PN99	24	

Vale ressaltar que todas as bactérias isoladas encontradas no tecido necrosado de *P. caribaeorum* do gênero *Bacillus* foram capazes de produzir proteases e foram identificadas como *Bacillus pumilus* (16 isolados) (Figura 14) e *Bacillus aerius* (1 isolado).

Varios estudos têm mostrado que a atividade proteolítica está relacionada com a virulência de bactérias patogênicas. Um exemplo clássico dessa relação é o gênero *Vibrio*. Esse gênero inclui espécies patogênicas de corais e outros organismos marinhos (HARVELL et al., 1999) como o *Vibrio coralliilyticus* responsável pelo branqueamento e lise do coral *Pocillopora damicornis* (BEN-HAIM et al., 2003).

Estudos mais recentes relacionaram a sua virulência com a excreção de enzimas proteolíticas (KIMES et al., 2012; MANN et al., 2014).

Figura 14. Atividade proteolítica dos isolados da espécie *Bacillus pumilus* (PN 70- PN 73) do tecido necrosado de *P. caribaeorum*.



Sussman et al. (2008) também observaram a atividade proteolítica em 150 isolados de bactérias provenientes de vários corais onde tiveram surtos de White syndrome (WS) nos Oceanos Índico e Pacífico. Autores indicaram que a produção de proteases pode ser considerada como fator de virulência.

Condições ambientais de grande impacto afetam a dinâmica da relação entre patógeno e hospedeiro, levando ao surgimento de doenças. Mann et al. (2014) relatou que dentre as estratégias de ataque de patógenos, a secreção de proteases favorecia a colonização do hospedeiro por bactérias.

Em pesquisas realizadas utilizando análise metagenômica sobre o efeito de branqueamento dos corais na Grande Barreira de Recife (GBR), Litmman et al. (2011) observaram que durante eventos de estresse térmico ocorreu um aumento da proliferação de *V. coralliilyticus* relacionado à produção de proteases extracelulares que funcionaram como fator de virulência para a lise do dinoflagelado *Symbiodinium* presente no coral *Acropora millepora*. Os autores concluíram que o aumento da expressão de genes proteolíticos com a elevação da temperatura poderia também ser devido a proliferação de organismos causadores de doenças.

Como já foi supracitado antes, um dos fatores de virulência de organismos patogênicos é a excreção de enzimas proteolíticas, as quais, dependendo do estado do

hospedeiro podem acarretar o aparecimento de doenças, devido a vulnerabilidade do mesmo, associados a fatores externos traumáticos.

Em virtudes das pesquisas realizadas por outros autores e comparando com os nossos dados, podemos inferir que, além do gênero *Bacillus*, os gêneros *Alteromonas*, *Vibrio* e *Marinobacter*, presentes apenas no tecido necrosado de *P. caribaeorum*, ambos com alta atividade proteolítica, podem contribuir para o processo necrótico do tecido desse zoantídeo.

5 CONCLUSÕES

- A densidade de bactérias heterotróficas totais no tecido necrosado foi maior que no tecido sadio do zoantídeo *P. caribaeorum*.
- A análise filogenética de bactérias isoladas do tecido de *P. caribaeorum* revelou que a maioria dos isolados pertenceu ao filo *Firmicutes*.
- No tecido sadio foi encontrado maior percentual de bactérias do gênero *Bacillus* do que no tecido necrosado.
- O gênero *Vibrio* apresentou maior número de isolados entre as bactérias isoladas do tecido necrosado comparando com as bactérias do tecido sadio, sugerindo que essas bactérias podem desempenhar um papel no desenvolvimento da doença necrosante de *P. caribaeorum*.
- A atividade proteolítica foi mais expressiva nas bactérias do tecido necrosado quando comparados com as bactérias do tecido sadio, sugerindo que esta atividade seja importante para o desenvolvimento da doença necrosante de *P. caribaeorum*.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, A. Disease in Zoanthids: dynamics in space and time. **Hydrobiology**, n. 460, p. 113–130, 2001.
- ACOSTA, A.; SAMMARCO, P.W.; DUARTE, L.F. New fission processes in the zoanthid *Palythoa caribaeorum*: description and quantitative aspects. **Bulletin of Marine Science**, n. 76, p. 1-26, 2005.
- AINSWORTH, T.D.; THURBER, R.V.; GATES, R.D. The future of coral reefs: a microbial perspective. **Trends in Ecology & Evolution**, vol. 25, n. 4, p. 233-240, 2010.
- AINSWORTH, T.D.; HOEGH-GULDBERG, O. Cellular processes of bleaching in the Mediterranean coral *Oculina patagónica*. **Coral Reefs**, n. 27, p. 593–597, 2008.
- ALEX, A.; SILVA, V.; VASCONCELOS, V.; ANTUNES, A. Evidence of unique and microbes in distantly related sympatric intertidal marine sponges (Porifera: Desmospongiae). **PloS ONE**, v. 8, e80653, 2013.
- ALLERS E.; NIESNER, C.; WILD, C.; PERNTHALER, J. Microbes enriched in seawater after addition of coral mucus. **Applied and Environmental Microbiology**, v.74, n.10, 2008.
- AMARAL, F.M.D.; RAMOS, C.A.C.; LEÃO, Z.M.A. N. et al., Checklist and morphometry of benthic cnidarians from the Fernando de Noronha Archipelago, Brazil. **Cahiers de Biologie Marine**, n. 50, p. 277- 290, 2009.
- ANITHAJOTHI, R.; UMAGOWALYA, G.; DURAIKANNU, K.; RAMKUMAR, B.; SANTHANA, M.K.; RAMAKRTINAN, C.M. Isolation and characterization of microbes associated with White pox disease coral (*Acroporidae*) from Palk Bay, southeast coast of India. **Asian Journal of Marine Science**, v. 1, n. 1, p. 6-8, 2013.
- APPELTANS, W.; BOUCHET, P.; BOXSHALL, G. A.; FAUCHALD, K.; GORDON, D. P.; HOEKSEMA, B. W.; POORE, G. C. B.; VAN SOEST, R. W. M.; STÖHR, S.; WALTER, T. C.; COSTELLO, M. J. (Ed.). World register of marine species. 2010. Disponível em <<http://www.marinespecies.org>>. Acesso em: 20 jul. 2014.
- ARAUJO, A.P.U.; BOSSOLAN, N.R.S. **Noções de Taxonomia e classificação- Introdução a Zoologia**. Instituto de Física de São Carlos, p. 34-38, 2006.
- ARAÚJO, G.H. **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**. 2013. p. 69. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular), Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.
- ARAÚJO, G.H.; GORLACH-LIRA, K.; MEDEIROS, D. S.; SASSI, C. F.C. Physicochemical and bacteriological seawater quality and sustainability of Cabo Branco (Brazil) coral reef. **Pan- American Journal of Aquatic Sciences**, v. 10, n.2, p. 94-104, 2015.

- AUSUBEL, F.M.; BRENT, R.; KINGSTON, R.E.; MOORE, D.D.; SKIDMAM, J.G.; SMITH, J.A. & STRUHL, K. **Current protocols in molecular biology**. John Wiley & Sons. New York, 1987.
- BAKER, A.C. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: diversity, ecology, and biogeography of *Symbiodinium*. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 661-689, 2003.
- BARASH, Y.; SULAM, R.; LOYA, Y.; ROSEMBERG, E. Bacterial strain BA-3 and a filterable factor cause a white plague like disease in corals from the Eilat coral reef. **Aquatic Microbial Ecology**, v.40, p. 183–189, 2005.
- BASTIDAS, C.; BONE, D. Competitive strategies between *Palythoa caribaeorum* and *Zoanthus sociatus* (Cnidaria: Anthozoa) at a Reef Flat environment in Venezuela. **Bulletin of Marine Science**, v. 59, n.3, p. 543-555, 1996.
- BAUMANN, P.; BAUMANN, L.; MANDEL, M.; ALEN, R.D. Taxonomy of aerobic marine eubacteria. **Journal of Bacteriology**, v.110, n.1, p. 402- 429, 1972.
- BEN-HAIM, Y.; ZICHERMAN-KEREN, M.; AND ROSENBERG, E. Temperature-regulated bleaching and lysis of the coral *Pocillopora damicornis* by the novel pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **Applied and Environmental Microbiology**, n.69, p.4236–4242, 2003.
- BEN-HAIM, Y.E.; ROSEMBERG, E. A novel *Vibrio sp.* pathogen of the coral *Pocillopora damicornis*. **Marine Biology**, n. 141, p. 47-55, 2002.
- BEN-HAIM, Y.; BANIM, E.; KUSHMARO, A.; LOYA, Y.; ROSENBERG, E. Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. **Environmental Microbiology**, v.1, p. 223–229, 1999.
- BOURNE, D. G.; MUNN, C. B. Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology**, v .7, p.1162–1174, 2005.
- BOURNE, D.G.; GARREN, M.; WORK, T.M.; ROSEMBERG, E.; SMITH, G.W. HARVELL, C.D. Microbiol disease and the coral holobiont. **Cell Press**, v. 17, n. 12, 2009.
- BRANDT, M.E.; MCMANUS, J.W. Disease incidence is related to bleaching extent in reef-building corals. **Ecology**, n. 90, v. 28 p. 59-67, 2009.
- BROWN, B.E.; BYTHELL, J.C. Perspectives on mucus secretion in reef corals. **Marine Ecology Progress Series**, n. 296, p. 291–309, 2005
- BRUSCA, R.C.; BRUSCA, G.J. **Invertebrados**. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 968. 2007.
- BURNETT, W.J.; BENZIE, J.A.H.; BEARDMORE, J.A.; RYLAND, J.S. Zoanthids (Anthozoa, Hexacorallia) from the Great Barrier Reef and Torres Strait, Australia: systematics, evolution and a key to species. **Coral Reefs**, n. 16, p. 55–68, 1997.

- CAMPOS, F. F. **Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Anthozoa) do litoral sul de Pernambuco**. 2011. 87 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Humana e Meio Ambiente) – Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, 2011.
- CARLOS, C.; TORRES, T.T.; OTTOBONI, L.M.M. Bacterial communities and species-specific associations with the mucus of Brazilian coral species. **Scientific Reports**, v.3, n.1624, 2013.
- CERVINO, J.M.; THOMPSON, F.L.; GOMEZ-GIL, B.; LORENCE, E.A.; GOREAU, T.J. The *Vibrio* core group induces yellow band disease in caribe Indo- Pacific reef- building corals. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n.5, p.1658-1671, 2008.
- CHAUD, L.C.S.; VAZ, P.; FELIPE, M.G.; Considerações sobre a produção microbiana e aplicações de proteases. **Nucleus**, v. 2, n. 2, 2007
- CHIMETTO, L.A.; BROCCHI, M.; GONDO, M.; GOMEZ-GIL, B.; THOMPSON, F.L. Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 6, p. 1818-26, 2009.
- CHIMETTO, L.A.; BROCCHI, M.; THOMPSON, C.C.; MARTINS, R.C.R.; RAMOS, H.R.; THOMPSON, F.L. *Vibrios* dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of the Brazilian coral *Mussismilia hispida*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 31, n.4, p. 312-319. 2008.
- CHIMETTO, L.A.; CLEENWERCK, I.; MOREIRA, A.P.B.; BROCCHI, M.; WILLEMS, A.; VOS, P.D., THOMPSON, F. L. *Vibrio Variabilis* sp. nov. and *Vibrio maritimus* sp. nov., isolated from *Palythoa caribaeorum*. **International Journal System Evolution Microbiology**, v. 61, n. 12, 2011.
- COLES, S.L.; BROWN, B.E. Coral bleaching – capacity for acclimatization and adaptation. In: SOUTHWARD, A.J; TYLER, P.A.; YOUNG, C.M.; FUIMAN, L.A. **Advances in Marine Biology**, v. 46, p. 183-223, 2003.
- CONNOR, N.; SIKORSKI, J., ROONEY, A.P.; KOPAC, S., KOEPEL, A.F. et al. Ecology of speciation in the genus *Bacillus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, p. 1349-1358, 2010.
- COSTA, D.L.; GOMES, P.B.; SANTOS, A.M.; VALENCA, N.S.; VIEIRA, N.A.; PEREZ C.D. Morphological plasticity in the reef zoanthid *Palythoa caribaeorum* as an adaptive strategy. **Annales Zoologici Fennici**, n. 48, p. 349–358, 2011.
- DENOVARO, R. E FRASCHETTI, S. Meiofaunal vertical zonation on hard-bottoms: comparison with soft-bottom meiofauna. **Marine Ecology Progress Series**, v. 230, p. 159-169, 2002.
- EILERS, H.; PERNTHALER, J.; GLOCKNER, F.O.; AMANN, R. Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3044–3051, 2000.

FAUTIN, D.G. Hexacorallians of the World, 2006. Disponível em <<http://www.geoportal.kgs.ku.edu/hexacoral/anemone2/index.cfm>>. Acesso em: 2 de Agosto de 2013.

FEINGOLD, J. Ecological studies of a cyanobacterial infection on a Caribbean sea plume *Pseudopterogorgia acerosa* (Coelenterata: Octocorallia). In: CHOAT, J.H. (ed.), **Proc. of the 6th International Coral Reef Symposium**, v. 3, p. 157–162, 1988.

FERREIRA, C.E.L.; FLOETER, S.R.; GASPARINI, J.L.; JOYEUX, J.C.; FERREIRA, B.P. Trophic structure patterns of Brazilian reef fishes: a latitudinal comparison. **Journal of Biogeography**, v. 31, p. 1093–1106, 2004.

FERRIER-PAGES C.; LECLERCQ, N.; JAUBERT, J.; PELEGRI, S.P. Enhancement of pico- and nanoplankton growth by coral exudates. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 21, p. 203–9, 2000.

FERRIER-PAGES, C.; GATTUSO, J.P.; CAUWET, G.; JAUBERT, J.; ALLEMAND, D. Release of dissolved organic carbon and nitrogen by the zooxanthellate coral *Galaxea fascicularis*. **Marine Ecology Progress Series**. v. 172, p. 265–74, 1998

FERRIER-PAGES, C.; GATTUSO, J. P.; DALOTTE, S.; JAUBERT, J. Effect of nutrient enrichment on growth and photosynthesis of the zooxanthellate coral *Stylophora pistillata*, n. 19, p. 103–113, 2000.

FLOETER, S.R.; GUIMARÃES, R.Z.P.; ROCHA, L.A.; FERREIRA, C.E.L.; RANGEL, C. A.; GASPARINI, J. L. Geographic variation in reef fish assemblages along the Brazilian coast. **Global Ecology and Biogeography**, v. 10, p. 423–431, 2001.

FLOETER, S.R.; KROHLING, W.; GASPARINI, J.L.; FERREIRA, C.E.L.; ZALMON, I.R. Reef fish community structure on coastal islands of the southeastern Brazil: the influence of exposure and benthic cover. **Environmental Biology of Fishes** v. 78, p. 147–160, 2007.

FRANCINI-FILHO, R.B.; CONI, E.O.C.; MEIRELLES, P.M.; AMADO-FILHO, G.M.; THOMPSON, F.L.; PEREIRA-FILHO, G.H.; BASTOS, A.C.; ABRANTES, D.P.; FERREIRA, C.M.; GIBRAN, F.Z.; GÜTH, A.Z. SUMIDA, P.Y.G.; OLIVEIRA, N.L.; KAUFMAN, L.; MINTE-VERA, C.V.; MOURA, R.L. Dynamics of Coral Reef Benthic Assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: Inferences on Natural and Anthropogenic Drivers. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2013.

FRIAS-LOPEZ, J.; ZERKLE, A.L.; BONHEYO, G.T.; FOUKE, B.W. Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band diseased, and dead coral surfaces. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2214–2228, 2002.

FRYDENBORG, B.; RKRDIET, C.J.; TEPLITSKI, M.; RITCHIE, K.B. Temperature-dependent inhibition of opportunistic *Vibrio* pathogens by native coral commensal bacteria. **Microbial Ecology**, n. 67, 392–401, 2014.

GERHARDT, P.; MURRAY, R.G.E.; WOOD, W.A.; KRIEG, N.R. **Methods for General and Molecular Bacteriology**. Massachusetts: American Society for Microbiology, 1994.

- GUZMAN, H.M., GUEVARA, C. Massive mortality of zooxanthellate reef organisms during the 1995 bleaching in Cayos Cochinos, Honduras. **Revista de Biología Tropical**, v.46, p. 165-73, 1998.
- HABERMANN, E. Palytoxin acts through Na^+ , K^+ , ATPase. **Toxicon**, n.27, v.11, p. 1171–1187, 1989.
- HARVELL, C.D.; ARONSON, R.; BARON, N.; CONNELL, J. The rising tide of ocean diseases: unsolved problems and research priorities. **Frontiers in Ecology and Environment**, v. 2, p. 375–382, 2004.
- HARVELL, C.D.; MOUCHKA, M.E.; HEWSON, I.; Coral-Associated Bacterial Assemblages: Current Knowledge and the Potential for Climate-Driven Impacts. **Integrative and Comparative Biology**, v. 50, n.4, p. 622-674, 2010.
- HARVELL, C.D.; KIM, K.; BURKHOLDER, J.M.; COLWELL, R.R.; EPSTEIN, P.R.; GRIMES, D.J. et al. Emerging marine diseases: climate links and anthropogenic factors. **Science**, v. 285, n. 5433, p. 1505–1510, 1999.
- HARVELL, D., KIM, K., QUIROLO, C., WEIR, J., SMITH, G. Coral bleaching and disease: Contributors to 1998 mass mortality in *Briareum asbestinum* (Octocorallia, Gorgonacea). **Hydrobiologia**, v. 460, p. 97-104, 2001.
- HAYWICK, D.W.; MUELLER, E.M. Sediment retention in encrusting *Palythoa spp.*—a biological twist to a geological process. **Coral Reefs**, n. 16, p. 39–46, 1997.
- HERON, S.F.; WILLIS, B.L.; SKIRVING, W.J.; EAKIN, C.M.; PAGE, C.A.; MILLER, I.R.. Summer hot snaps and winter conditions: modelling white syndrome outbreaks on Great Barrier Reef corals. **PLoS ONE**, n. 5, v. 8, 2010.
- HOEGH-GULDBERG, O.; Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. **Marine Freshwater Research**, v. 50, p. 839-866, 1999.
- HONG, MEI-JHU; YU, YI-TING; CHEN, C.A.; CHIANG, PEI-WEN & TANG, SEN-LI. Influence of species specificity and other factors on bacteria associates with the coral *Sylophora pistillata* in Taiwan, **Applied and Environmental Microbiology**, v.75, n. 24, p. 7797-7806, 2009.
- HUGHES, T.P.; BAIRD, A.H.; BELLWOOD, D.R.; CARD, M.; CONNOLLY, S.R.; FOLKE, C.; GROSBERG, R.; HOEGH-GULDBERG, O.; JACKSON, J.B.; KLEYPAS, J.; LOUGH, J.M.; MARSHALL, P.; NYSTRÖM, M.; PALUMBI, S.R.; PANDOLFI, J.M.; ROSEN, B.; ROUGHGARDEN, J. Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. **Science**, v. 301, p. 929-933, 2003.
- IREI, Y, SINNIGER, F.; REIMER, J.D., Descriptions of two azooxanthellate *Palythoa species* (Subclass Hexacorallia, Order Zoantharia) from the Ryukyu Archipelago, southern Japan. **ZooKeys**, v. 478, p. 1-26, 2015.
- JENSEN, S.; NEUFELD, J.D.; BIRKELAND, N.K.; HOVLAND, M.; MURRELL, J.C. Insight into the microbial community structure of a Norwegian deep-water coral reef

environment. Deep Sea Research Part I. **Oceanographic Research Papers**, v. 55, n. 11, p. 1554-1563, 2008.

KELLOG, C.A.; PICENO, Y.M.; TOM, L.M.; DESANTIS, T.Z.; GRAY, M.A. Comparing Bacterial community composition between healthy and White Plague-Like disease states in *Orbicella annularis* using PhyloChipTM g3 microarrays. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, e79801, 2013.

KEMP, D.W.; COOK, C.B.; LAJEUNESSE, T.C.; BROOKS, W.R. A comparison of the thermal bleaching responses of the zoanthid *Palythoa caribaeorum* from three geographically different regions in south Florida. **Journal of Experimental Marine Biology Ecology**, v. 335, p. 266–276, 2006.

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

KIMES, N.E.; GRIM, C.J.; JOHNSON, W.R.; HASAN, N.A.; TALL, B.D.; KOTHARY, M.H.; KISS, H.; MUNK, A.C.; TAPIA, R.; GREEN, L.; DETTER, C.; BRUCE, D.C. BRETTIN, T.S.; COLWELL, R.R.; MORRIS, P. J. Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. **The International Society for Microbial Ecology Journal**, v.6, p. 835-846, 2012.

KNOWLTON, N. Coral reefs. **Current Biology**, 18 (1), p. 18-21, 2008.

KREDIET, C.J.; RITCHIE, K.B.; PAUL, V.J.; TEPLITSKI, M. Coral-associated micro-organisms and their roles in promoting coral health and thwarting diseases. **Proceedings of The Royal Society**, 280, p. 2012-2328, 2013.

KUEK, F.W.I.; LIM, LI-FANG, L. NGU, LIN-HUI; MUJAHID, A.; LIM, PO-TEEN; LEAW, CHUI-PIN; MULLER, M. The potential roles of bacterial communities in coral defence: a case study at Talang- Talang Reef. **Ocean Science Journal**, v. 50, n.2, p. 269-282, 2015.

LANE, D.J. 16S/23S rRNA sequencing. In: STACKEBRANDT, E. and GOODFELLOW, M. (ed.), **Nucleic acid techniques in bacterial systematics**. Chichester, United Kingdom: John Wiley and Sons, p. 115–175. 1991.

LEÃO, Z.A.M.N. **The Coral Reefs of Southern Bahia**. In: HETZEL, B., CASTRO, C.B. (Eds.). Corals of Southern Bahia. 1ed. Rio de Janeiro: Nova Fronteira. p.151-159, 1994.

LEÃO, Z.A.M.N.; DOMINGUEZ, J.M.L. Tropical coast of Brasil. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 1-6, p. 112-122, 2000.

LEÃO, Z.M.A.N. **Guia para identificação dos corais do Brasil**. 1ed. Salvador: Universidade Federal da Bahia, p. 57, 1986.

- LITTMAN, R.A.; BOURNE, D.G. WILLS, B.L. Responses of coral-associated bacterial communities to heat stress differ with *Symbiodinium* type on the same coral host. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 1978-1990, 2010.
- LITTMAN, R.; WILLS, B.L.; BOURNE, D.G. Metagenomic analysis of the coral holobiont during a natural bleaching event on the Great Barrier Reef. **Environmental Microbiology Reports**, v.3, n.6, 2011.
- LUNA, G.M.; BONGIORNI, L.; GILI, C.; BIAVASCO, F.; DANOVARO, R. *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals, **Environmental Microbiology Reports**, v. 2, p. 120-127, 2009.
- LUNA, G.M.; BIAVASCO, F.; DANOVARO, R. Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. **Environmental Microbiology**, v 9, n. 7, p. 1851–1857, 2007.
- MANN, W T.; BEACH-LETENDRE, J.; MYDLARZ, L.D. Interplay between proteases and protease inhibitors in the sea fan- *Aspergillus* pathosystem, **Marine Biology**, n. 161, p. 2213-2220, 2014.
- MANTELATTOA, M.C.; FLEURYB, B.G. MENEGOLA, C.; CREED, J.C. Cost–benefit of different methods for monitoring invasive corals on tropical rocky reefs in the southwest Atlantic. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 449, p. 129-134, 2013.
- MARQUES, A.C.; COLLINS, A.G. Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarians evolution. **Invertebrate Biology**, n. 123, v. 1, p.23-42, 2004.
- MENDONÇA-NETO, J.P.; GAMA, B.A.P. The native *Palythoa caribaeorum* overgrows on invasive species in the intertidal zone. **Coral Reefs**, n. 28, p. 497–497, 2009.
- MENEZES, C.B.A. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the North coast of São Paulo state, Brazil. **Microbiological Research**, n.165, p.466-484, 2010.
- MIGOTTO, A.E. Anthozoan bleaching on the southeastern coast of Brazil in the summer of 1994. In: **Proceedings of International Conference on Coelenterate Biology**, 6, 1997, Leiden. Abstracts. Netherlands, p. 329-335, 1997.
- MMA (Ministério do Meio Ambiente). **Atlas dos recifes de coral nas unidades de conservação brasileiras**. PRATES, A.P.L. (ed.) 1ed. Brasília: Dupligráfica, p. 180, 2003.
- MOBERG, F.; FOLKE, C. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. **Ecological Economics**, n. 29, p. 215- 233, 1999.
- MOORE, R.E.; SCHEUER, P.J. Palytoxin: a new marine toxin from a coelenterate. **Science**, v. 172, n. 3982, p.495-498, 1971.
- MOURA, R.L. Brazilian reefs as priority areas for biodiversity conservation in the Atlantic Ocean. **Proceedings of 9th International Coral Reef Symposium**, v.2, p. 917–920, 2002.

MOUCHKA, M.E.; HEWSON, I.; HARVELL, C.D. Coral-Associated bacterial assemblages: current knowledge and the potencial for climate- driven impacts. **Integrative & Comparative Biology**, v. 50, n. 4, p. 662-674, 2010.

MULLER, E.M.; ROGERS, C.S.; SPITZACK, A.S.; VAN WOESIK, R. Bleaching increases likelihood of disease on *Acropora palmata* (Lamarck) in Hawksnest Bay, St John, US Virgin Islands. **Coral Reefs** v. 27, p. 191-195, 2008.

MUNDAY, R. Palytoxin toxicology: animal studies. **Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology**, n. 57, p. 470–7, 2011.

NITHYANAND, P.; PANDIAN, S.K. Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. **FEMS Microbiology Societies**, v. 69, p. 384- 394, 2009.

O'CONNOR-SÁNCHEZ, A.; RIVERA-DOMÍNGUEZ, A.J., DE LOS SANTOS-BRIONES, C.; LÓPEZ-AGUIAR, L.K., PEÑA-RAMÍREZ, Y.J.; PRIETO-DAVO, A. *Acidobacteria* appear to dominate the microbiome of two sympatric Caribbean sponges and one zoanthid. **Biological Research**, 47 (1), 67, 2014.

OLSON, N.D.; AINSWORTH, T.D.; GATES, R.D. & TAKABAYASHI, M. Diazotrophic bacteria associated with Hawaiian *Montipora* corals: diversity and abundance in correlation with symbiotic dinoflagellates. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, n. 371, p. 140–146, 2009.

PÉREZ, C.D.; VILA-NOVA, D.A.; SANTOS, A.M.; Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (DUCHASSAING; MICHELOTTI, 1860) from littoral of Pernambuco, Brazil. **Hydrobiology** v. 548, p. 207–215, 2005.

PORPORATO, E.M.D.; GIUDICE, A.L.; MICHAUD, L.; DOMENICO, E. DE, SPANO, N. Diversity and antibacterial activity of the bacterial communities associated with two Mediterranean Sea pens, *Pennatula phosphorea* and *Pteroeides spinosum* (Anthozoa: Octocorallia), **Invertebrate Biology**, v. 66, p. 701-714.

RABELO, E.F. **Diversidade de microrganismos associados aos Zoantídeos (CNIDARIA, ZOANTHIDAE)**. 2012. Tese (Tese em Ciências Marinhas Tropicais), Instituto de Ciências do Mar, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

RAMOS, V.; VASCONCELOS, V. Palytoxin and analogs: biological and ecological effects.. **Marine Drugs**. v.8, n.7, p. 2021-2037, 2010.

REIMER, J.D.; HIROSE, M.; NISHISAKA, T.; SINNIGER, F.; ITANI, G. *Epizoanthus* spp. associations revealed using DNA markers: a case study from Kochi, Japan. **Zoological Science**, n. 27, v. 9, p. 729–734, 2010.

REIMER, J.D.; IREI, Y.; FUJII, T. Two new species of *Neozoanthus* (Cnidaria, Hexacorallia, Zoantharia) from the Pacific. **ZooKeys**, n. 246, p.69–87, 2012.

- REIMER, J.D.; TAKISHITA, K.; MARUYAMA, T. Molecular identification of symbiotic dinoflagellates (*Symbiodinium* spp.) from *Palythoa* spp. (Anthozoa: Hexacorallia) in Japan. **Coral Reefs**, v. 25, p. 521–527, 2006a.
- REIMER, J.D.; ONO, S.; TAKISHITA, K., TSUKAHARA, J., MARUYAMA, T. Molecular evidence suggesting species in the zoanthid genera *Palythoa* And *Protopalythoa* (Anthozoa: Hexacorallia) are congeneric. **Zoology Science**, n. 23, v. 87–94, 2006b.
- REIS, A.M.M.; ARAÚJO, S.D.; MOURA, R L.; FRANCINI-FILHO, R.B.; PAPPAS JR., G.; COELHO, A.M A.; KRÜGER, R.H.; THOMPSON, F.L. Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1378-87, abr. 2009.
- RICHARDSON, L. Coral diseases: what is really known? **Trends of Ecology and Evolution**, v. 13, p. 438–443, 1998.
- RITCHIE, K.B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 322, p. 1-14, 2006.
- ROHWER, F.; SEGURITAN, V.; KNOWLTON, N. Diversity and distribuicion of coral-associated bacteria. **Marine Ecology Progress Series**, v. 243, p. 1-10, 2002.
- ROSENBERG, E.; BEN-HAIM, Y. Microbial diseases of corals and global warming. **Environmental Microbiology**, n. 4, p. 318–326, 2002.
- ROSENBERG, E.; KOREN, O.; RESHEF, L.; EFRONY, R.; ZILBER-ROSENBERG, I. The role of microorganisms in coral health, disease and evolution. **Nature Reviews Microbiology**, n. 5, p. 355- 362, 2007.
- RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Invertebrate Zoology: A functional evolutionary approach**. 7 ed. Belmont: Thomson, 963p. 2003.
- RYLAND, J.S.; PUTRON, S.; SCHELTEMA, R.S.; CHIMONIDES, P.J.; ZHADAN, D.G. Semper's (zoanthid) larvae: pelagic life, parentage and other problems. **Hydrobiologia**, v. 440, p. 191–198, 2000.
- SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y: 2012.
- SHNIT-ORLAND, M. E KUSHMARO, A. Coral mucus-associated bacteria: a possible first line of defense. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 67, n.3, p. 371-80, mar, 2009.
- SINNIGER, F.; MONTOYA-BURGESS, J.I.; CHEVALDONNE, P.; PAWLOWSKI, J. Phylogeny of the order Zoantharia (Anthozoa, Hexacorallia) based on mitochondrial ribosomal genes. **Marine Biology**, n. 147, p.1121–1128, 2005.
- SINNIGER, F.; OCAÑA, O.V.; BACO, A.R. Diversity of zoanthids (Anthozoa: Hexacorallia) on Hawaiian seamounts: description of the Hawaiian gold coral and additional zoanthids. **PLoS ONE**, n. 8:e52607, p. 1-13, 2013.

SINNIGER, F.; REIMER, J.D.; PAWLOWSKI, J. The Parazoanthidae DNA taxonomy: description of two new genera. **Marine Biodiversity**, n. 40, p. 57–70, 2010.

SMIBERT, R.; KRIEG, N.R. Phenotypic characterization. In: GERHARDT, P. et al. (eds.). **Methods for general and molecular bacteriology**, Washington: ASM Press, 1994.

SOARES, C.L.S.; PERÉZ, C.D.; MAIA, M.B.S.; SILVA, R.S.; MELO, L.F.A. Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoanhtídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16 v. 4, p. 463-468, 2006.

SPALDING, M. D.; RAVILIOUS, C.; GREEN, E.P. **World Atlas of Coral Reefs**. 1ed. London: University of California Press, p 432, 2001.

SUN, W.; ZHANG, F.; HE, L.; LI, Z. Pirosequencing reveals diverse microbial community associated with the zoanthid *Palythoa australiae* form the South China Sea. **Microbiology Ecology**, n. 67, p. 942-950, 2014.

SUSSMAN, M.; WILLIS, B.L.; VICTOR, S.; BOURNE, D. G Coral Pathogens Identified for White Syndrome (WS) Epizootics in the Indo-Pacific. **PLoS ONE**, v.3, n.6, p. 1-14, 2008.

SWEET, M.J.; BURN, D.; CROQUER, A.; LEARY, P. Characterisation of the bacterial and fungal communities associated with diferente lesion sizes of Dark Spot syndrome occurring in the coral *Stephanocoenia intersepta*. **PLoS ONE**, v.8, e:62580, 2013.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A. AND KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

THOMPSON, F.L.; IIDA, T.; SWINGS, J. Biodiversity of vibrios. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, n. 68, p. 403–431, 2004.

THOMPSON, F.L.; GOMEZ-GIL, B.; VASCONCELOS, A.T.; SAWABE, T. Multilocus sequence analysis reveals that *Vibrio harveyi* and *V. campbellii* are distinct species. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 4279–4285, 2007.

TOUT, J.; SIBONI, N.; MESSER, L.F.; GARREN, M.; STOCKER, R.; WEBSTER, N.S.; RALPH, P.J.; SEYMOUR, J.R. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. **Frontiers in Microbiology**, doi: 10.3389/fmicb.2015.

USHIJIMA, B.; SMITH, A.; AEOBY, G.S. CALLAHAN, S.M. *Vibrio owensii* induces the tissue loss disease Montipora White Syndrome in the Hawaiian Reef Coral *Montipora capitata*. **PLoS ONE**, DOI: 10.1371, 2012.

WEIL, E.; SMITH, G.; GIL-AGUDELO, D.L. Status and progress in coral reef disease research. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 69, p. 1–7, 2006.

WIESE, J.; THIEL, V.; NAGEL, K.; STAUFENBERG, T.; IMHOFF, T. Diversity of antibiotic-active bacteria associated with the brown alga *Lamiria saccharina* from the Baltic Sea. **Marine Biotechnology**, v. 11, n. 2, p. 287-300, 2009.

ZHENYU, X.; SHAOWEN, K.; CHAOQUN, H.; ZHIXIONG, Z.; SHIFENG, W.; YONGCAN, Z. First characterization of bacterial pathogen, *Vibrio alginolyticus*, for *Porites andrewsi* White Syndrome in the South China Sea. **PLoS ONE**, v.8, e75425, 2013.