



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE HUMANA E MEIO AMBIENTE

Felipe Ferreira Campos

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO
MUCO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum*
(CNIDARIA, ANTHOZOA) DO LITORAL SUL DE
PERNAMBUCO**

Vitória de Santo Antão

2011

Felipe Ferreira Campos

**DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO
MUCO DO ZOANTÍDEO *Palythoa caribaeorum*
(CNIDARIA, ANTHOZOA) DO LITORAL SUL DE
PERNAMBUCO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente da Universidade Federal de Pernambuco como requisito para obtenção do título de Mestre em **Saúde Humana e Meio Ambiente**.

Área de Concentração: Saúde e Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez

Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia

Vitória de Santo Antão

2011

Catálogo na fonte
Sistema de Bibliotecas da UFPE - Biblioteca Setorial do CAV

- C198d Campos, Felipe Ferreira
Diversidade de bactérias associadas ao muco do zoantídeo
Palythoa Caribaeorum (Cnidaria, Anthozoa) do litoral sul de Pernambuco
/ Felipe Ferreira Campos. Vitória de Santo Antão: O Autor, 2011.
xii, 73 folhas: il.; tab.; fig.
- Orientador: Prof. Dr. Carlos Daniel Pérez
Co-Orientador: Prof. Dr. José Eduardo Garcia
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco,
CAV, Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente.
- Inclui anexos e bibliografia.
1. Cnidários. 2. *Palythoa caribaeorum* - Taxonomia. 3. Recifes costeiros -
Porto de Galinhas e Suape - Litoral sul de Pernambuco. I. Título.
- 593.5 CDD (21.ed.) **BIBCAV/UFPE-019/2011**

Programa de Pós-Graduação em Saúde Humana e Meio Ambiente – Mestrado Acadêmico

FELIPE FERREIRA CAMPOS

“DIVERSIDADE DE BACTÉRIAS ASSOCIADAS AO MUCO DO ZOANTÍDEO *PALYTHOA*
CARIBAEORUM (CNIDARIA, ANTHOZOA) DO LITORAL SUL DE PERNAMBUCO”

DISSERTAÇÃO APROVADA em 27 de maio de 2011

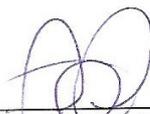
Banca Examinadora



Prof^a. Dr^a. Christine Lamenha Luna Finkler



Prof^a. Dr^a. Fernanda Maria Duarte do Amaral



Prof. Dr. Laurival Antônio Vilas Boas

Dedico à Doutora Carmen Alonso, primeira orientadora,
pelo exemplo de amor e dedicação à Ciência.

AGRADECIMENTOS

À FACEPE, pelo suporte financeiro para a realização desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Carlos Pérez, por ter confiado a mim a tarefa de desenvolver este projeto e por todo o suporte dado ao longo do mestrado;

Ao Prof. Dr. José Eduardo Garcia, por ter me ensinado a dar os primeiros passos dentro do mundo da Genética e por toda sua simplicidade, amizade e horas de histórias bem contadas durante nossas viagens;

Ao Prof. Dr. César Andrade, coordenador deste Programa de Pós-Graduação, por toda sua gentileza e solicitude sempre que requisitado;

À Prof^a Dr^a Christine Lamenha e ao Prof. Dr. Leandro Finkler, por terem aberto as portas do seu laboratório para mim e por terem dado todo o suporte num momento crítico deste projeto;

À competentíssima Dr^a Michelle Oliveira, por ter clariado o mundo da Microbiologia que para mim, até então, era obscuro. Sem seu auxílio talvez não conseguisse concluir este trabalho a tempo;

A todos os técnicos do CAV/UFPE, que sempre foram muito atenciosos e competentes no seu trabalho;

Aos colegas dos Laboratórios de Biotecnologia e Fármacos e de Biodiversidade/UFPE, pelos momentos agradáveis e pelo auxílio nos trabalhos de bancada e de campo;

A todos do Laboratório de Genética de Bactérias/UNESP, na figura do Prof. Dr. Manoel Victor, pelos ótimos dias de trabalho sequenciando nossas amostras, e em especial à doutoranda Camila Davolos, pela ótima recepção em Jaboticabal/SP e por sua extrema dedicação e competência na realização desta etapa do projeto;

À Viviane Schuch (UNESP), pelo auxílio com as ferramentas da bioinformática;

A todos os colegas da primeira turma do PPGSHMA, em especial, Daniel, Camilla e Débora, pelos momentos agradabilíssimos que passamos juntos durante esta caminhada;

À Adalva, por ser mais do que uma funcionária da Pós-Graduação do CAV, e sim, uma verdadeira amiga. Desde o primeiro momento sempre nos tratou com uma educação e um carinho inimagináveis neste meio;

A todos os colegas do LIPY/UFPB, representado pela Prof^a Dr^a Carmen Alonso e pelo Prof. Dr. Martin Christoffersen, pois foi lá onde tudo isso começou;

Aos colegas (irmãos) de turma da graduação, representados por Hélio Nobel e Jotinha, por toda a amizade e companheirismo desde a época da ralação em João Pessoa;

À minha mãe, pelo amor, dedicação e confiança durante toda a minha vida e durante a realização deste trabalho;

Ao meu pai e a Lúcia, pelo amor e pelo apoio que sempre me dispuseram, principalmente durante o período deste mestrado quando estivemos mais próximos;

Aos meus irmãos, que sempre marcam a minha vida com as suas peculiaridades;

A minha “quase” esposa, Vanessa, por todo seu amor e por toda a sua paciência e compreensão, especialmente, durante este trabalho. Este trabalho tem muita participação dela;

Ao Senhor Deus, criador de todo o Universo, dos cnidários e das bactérias, declaro toda minha dependência e reverência.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	ix
LISTA DE ABREVIATURAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
CAPÍTULO 1	1
1.1 Introdução	1
1.2 Objetivos	4
1.2.1 Objetivo Geral	4
1.2.2 Objetivos Específicos	4
1.3 Revisão da Literatura	5
1.3.1 O Filo Cnidaria, a Ordem Zoanthidea e <i>Palythoa caribaeorum</i>	5
1.3.2 Os Recifes de Corais	6
1.3.3 O muco dos corais	8
1.3.4 Os microrganismos marinhos	9
1.3.5 Técnicas de cultivo em laboratório	10
1.3.6 Doenças em corais e zoantídeos	11
1.3.7 O branqueamento em corais e zoantídeos	14
1.3.8 Farmacologia e estudos de microbiota em <i>Palythoa caribaeorum</i>	16
1.3.9 Culturabilidade de bactérias marinhas em condições de laboratório	18
1.3.10 Estudos de microbiota associada a corais e zoantídeos no Brasil	19
CAPÍTULO 2	21
Bacterial diversity associated with mucus of healthy and bleached zoanthid <i>Palythoa caribaeorum</i> from littoral of Pernambuco state, Brazil.	
2.1 Resumo	22
2.2 Abstract	23
2.3 Introdução	24
2.4 Material e Métodos	27

2.4.1	Localidade e condições de coleta	27
2.4.2	Isolamento e preservação das linhagens	27
2.4.3	Extração do DNA e PCR do DNA obtido	28
2.4.4	Sequenciamento do 16S rDNA	28
2.4.5	Análise das sequências obtidas	28
2.5	Resultados e discussão	30
2.6	Referências	42
	DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	52
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXOS	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Colônias saudáveis de <i>P. caribaeorum</i> de Porto de Galinhas	6
Figura 2	Colônia afetada pela <i>black band disease</i>	13
Figura 3	Colônias branqueadas de <i>P. caribaeorum</i> de Porto de Galinhas	14
Figura 4	Eletromicrografia de uma secção de <i>O. patagonica</i> infectada por <i>V. shiloi</i>	16
Figura 5	Cultura de bactéria obtida do muco de <i>P. caribaeorum</i>	18
Figura 6	Mapa da costa do estado de Pernambuco mostrando os dois locais de coleta	27
Figura 7	Gráfico de dominância entre as classes de bactérias encontradas	31

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1 Lista resumida das espécies de bactérias isoladas do muco de *P. caribaeorum*
- Tabela 2 Clusters das bactérias encontradas no muco de *Palythoa caribaeorum*

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por cento
°C	Graus Celsius
γ	Gamma
α	Alfa
\geq	Maior ou igual que
\leq	Menor ou igual que

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitro
ml	Mililitro
Da	Daltons
UV	Ultravioleta
dNTP	Desoxirribonucleotídeo fosfatado
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool

RESUMO

O zoantídeo *Palythoa caribaeorum* é um cnidário colonial cujo os pólipos são conectados por um espesso tecido que possui partículas minerais incorporadas e habita extensas áreas dos recifes costeiros no Brasil. Este zoantídeo é popularmente conhecido por "baba-de-boi", por secretar um muco muito viscoso. O muco produzido por corais, animais que são filogeneticamente próximos ao zoantídeos, consiste de um conjunto complexo de Eukarya, Archaea e Bacteria. O objetivo deste estudo foi realizar uma caracterização taxonômica da microbiota presente no muco de colônias saudáveis e branqueadas de *P. caribaeorum*. O muco foi coletado nos recifes costeiros de Porto de Galinhas e de Suape, litoral sul de Pernambuco, em 2010. O isolamento das bactérias foi realizada utilizando o meio Ágar Marinho. O PCR dos segmentos 16S rDNA foi realizado utilizando os primers universais 27F e 1492R. O Sequenciamento dos fragmentos foi realizado no sequenciador ABI 3100 e a qualidade das sequências foram verificadas usando o programa Sequencing analysis 3.4 e, então, comparadas com as sequencias depositadas no GenBank usando o algoritmo Blastn. Um total de 50 amostras de bactérias isoladas de colônias saudáveis e branqueadas foram analisadas. O grupo dominante foi γ -Proteobacteria com 36 isolados (72%), seguido por α -Proteobacteria e Actinobacteria com seis isolados (12%) cada, e Firmicutes com dois isolados (4%). O gênero *Vibrio* foi o mais comum (50%), corroborando trabalhos anteriores em que este gênero foi o mais comum associado aos cnidários. Sequências de alguns isolados foram relacionados ao nível de espécie (97%) aos já depositados no GenBank, entre elas, espécies com potencial biotecnológico interessante, como bactérias do gênero *Alcanivorax*, que usa hidrocarbonetos derivados do petróleo como fonte de carbono e energia; e bactérias dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Micrococcus* e *Pseudoalteromonas*, grupos conhecidos por produzir compostos antimicrobianos e potentes toxinas marinhas. Algumas das sequências dos isolados foram relacionados com patógenos de seres humanos como *V. alginolyticus* e *V. proteolyticus*, e outras relacionadas a espécies do gênero *Pseudoalteromonas*, que podem ter participação no fenômeno do branqueamento. Outros isolados podem representar novas espécies uma vez que suas seqüências mostrou uma baixa similaridade com os taxa já conhecidos e muitos deles foram registrados pela primeira vez no muco de *P. caribaeorum*. É importante intensificar os estudos de diversidade microbiana neste zoantídeo para entender melhor o papel dessas bactérias nas propriedades farmacológicas do muco.

Palavras-Chave: microbiota; 16S rDNA; cnidários; branqueamento; recifes costeiros.

ABSTRACT

The zoanthid *Palythoa caribaeorum* is a colonial cnidarian anthozoan in which the polyps are connected by a thick tissue that incorporate mineral particles, and inhabits extensive areas on coastal reefs in Brazil. This zoanthid is commonly named “baba-de-boi” (“ox slaver”) to secrete a very viscous mucus. The mucus produced by corals, animals that are phylogenetically similar to zoanthids, consists of a complex assemblage of Eukarya, Archaea and Bacteria. The aim of this study was to perform a taxonomic characterization of the microbiota present in the mucus of healthy and bleached colonies of *P. caribaeorum*. Mucus was collected in the coastal reefs of Porto de Galinhas and Suape, south coast of Pernambuco state, in 2010. The isolation of bacteria was performed using Marine Agar as the culture medium. Polymerase Chain Reaction of 16S rDNA segments was carried out using universal primers 27F and 1492R. Sequencing of fragments was performed in ABI 3100 and sequences quality were checked using Sequencing Analysis 3.4 and compared to *GenBank* database using BlastN. A total of 50 bacterial samples isolated from healthy and bleached colonies were analysed. The dominant group was γ -Proteobacteria with 36 isolates (72%), followed by α -Proteobacteria and Actinobacteria with six isolates (12%) each, and Firmicutes with two isolates (4%). The *Vibrio* genus was the most common (50%), corroborating previous works in which this genus was the most common associated with cnidarians. Sequences of some isolates were related at species level (97%) to those already deposited in the *GenBank*, among them, species with interesting biotechnological potential such as from the genus *Alcanivorax*, that uses petroleum oil hydrocarbons as sources of carbon and energy; and from the genera *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas*, *Pseudoalteromonas* and *Micrococcus*, formerly known to produce antimicrobial compounds and potent marine toxin. Some of the sequences of the isolates were related to bacterial pathogens of humans, as *V. alginolyticus* and *V. proteolyticus*, and species of the genus *Pseudoalteromonas* that might play a role in the phenomenon of bleaching have been found only in colonies of bleached *Palythoa*. Other isolates may represent new species once their sequences showed a rather low similarity towards formally known taxa and many of them were first recorded in the mucus of *P. caribaeorum*. It is important to intensify studies of microbiota diversity in this zoanthid to better understand the role of those bacteria in the pharmacological properties of the mucus.

Keywords: microbiota; 16S rDNA; cnidarians; bleaching; coastal reefs.

CAPÍTULO 1

1.1 Introdução

Os cnidários são importantes componentes dos recifes de corais por participarem ativamente da construção desses ricos ecossistemas e por serem um dos grupos mais diversos dentro desses ambientes. Os zoantídeos, assim como os corais, são comuns e abundantes na maioria dos recifes de corais de todo o mundo. Mas dentre outras características, eles diferem dos corais, por não apresentarem um exoesqueleto de carbonato de cálcio (Ryland & Lancaster 2003).

O zoantídeo *Palythoa caribaeorum* é um zoantídeo zooxantelado comum nos recifes do Caribe e do Brasil. Este zoantídeo acompanha quase que toda a distribuição dos ambientes recifais ao longo da costa brasileira, desde a costa do Ceará até Santa Catarina (Neves *et al.* 2002). Nesses recifes, *P. caribaeorum* é um forte competidor e por isso eles chegam a formar imensos tapetes que cobrem grandes áreas do substrato recifal, inclusive em Pernambuco (Pérez *et al.* 2005). Essa dominância é facilitada por sua tolerância a estresses ambientais, por sua alta taxa de reprodução e por produzirem uma potente toxina, a palitoxina (Sebens 1982; Acosta & Asbahr, 2000; Seeman *et al.* 2009).

Os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais ricos e diversos de todo o planeta (Connell 1978). Apenas um dos 33 filos animais que existem no planeta não ocorre nos recifes de corais (Norse 1993). Além da rica biodiversidade que vai de pequenos vermes até grandes mamíferos, eles suportam uma grande gama de micronichos onde há dominância de microrganismos. Além da importância ecológica, os recifes contribuem para a economia de muitos países através da indústria pesqueira, por serem berçários naturais e fonte de recursos para muitas espécies de peixes, e do ecoturismo, pois atraem milhares de visitantes todos os anos por suas belezas naturais (Bourne *et al.* 2009). Apesar de todos esses benefícios agregados a esses ecossistemas, acredita-se que 20% dos recifes de corais do mundo já foram destruídos (Wilkinson 2008).

Os corais são animais filogeneticamente próximos aos zoantídeos, e por isso muito da sua biologia pode ser extrapolada para *P. caribaeorum*. O muco dos corais abriga representantes dos três domínios da vida, Archaea, Eubacteria e Eukarya (Wegley *et al.* 2007). As bactérias são os principais componentes bióticos desse muco e juntamente com outros microrganismos, algas endossimbióticas (zooxantelas) e com o próprio coral, formam o coral holobionte (Rohwer *et al.* 2002). Neste complexo simbiote, há uma estreita relação de dependência entre seus integrantes, e qualquer distúrbio nesse padrão pode afetar a saúde do hospedeiro. Dentre várias funções, o muco atua como substrato para o crescimento desses microrganismos e protege os animais da dessecação e dos raios ultravioleta (Lewis & Price 1976). Os microrganismos que habitam este biofilme são capazes de produzir toxinas e antibióticos contra predadores e/ou competidores (Kellogg 2004). Enquanto que o estudo da microbiota associada ao muco de corais já foi objeto de vários autores, o conhecimento acerca da microbiota associada aos zoantídeos ainda é incipiente.

As bactérias marinhas consistem numa interessante fonte de recursos genéticos com fins biotecnológicos, mas apesar disso, os oceanos representam um dos mais significantes e menos compreendidos ambientes naturais habitados por microrganismos do planeta (Martin-Cuadrado *et al.* 2007). Essas bactérias têm um importante papel fisiológico e ecológico dentro dos ecossistemas recifais, principalmente relacionados à nutrição e à defesa. Nas comunidades de bactérias que habitam os corais já foram identificadas espécies reportadas em seres humanos e, também, patógenos de organismos marinhos e terrestres (Rohwer *et al.* 2002). A microbiota associada ao muco dos cnidários é única e difere da microbiota da água do mar. Entender como a associação entre os microrganismos e os cnidários muda o longo do tempo é a chave para entender a saúde dos ecossistemas recifais.

Vários estudos já demonstraram a importância do complexo holobionte na saúde dos corais e dos ecossistemas recifais como um todo. Espécies dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Bacillus* e *Paracoccus* são componentes comuns da microbiota associada aos cnidários e o filo Proteobacteria quase sempre é o mais comum dentro dessas comunidades microbianas. Para analisar esta diversidade, técnicas de cultivo e independentes de cultivo são empregadas conjuntamente por serem complementares. Por se acreditar que até 95% dos microrganismos não são cultiváveis, os metagenomas de muitos ambientes tem sido explorados nos últimos anos para acessar a diversidade desses microrganismos de inúmeras fontes, inclusive dos cnidários (Fuhrman & Campbell 1998).

As doenças dos corais e o branqueamento têm sido apontados como uma das principais causas do declínio dos recifes nos oceanos Atlântico, Índico e Pacífico (Green &

Bruckner 2000; Kaezmarsky 2006). Essas doenças são provocadas por patógenos oportunistas, somado a múltiplos agentes estressores ambientais, como elevação da temperatura e eutrofização da água do mar como consequência da descarga de esgotos no mar (Sutherland *et al.* 2004). Bactérias comuns em descarga de esgotos já foram encontradas associadas aos cnidários. Por exemplo, uma doença de corais denominada *black band disease* pode estar associada à contaminação fecal de origem humana (Frias-Lopez *et al.* 2002).

O fenômeno do branqueamento é resultado da expulsão das zooxantelas do tecido dos animais em consequência da ação de geralmente uma bactéria e não de um complexo, como nas outras doenças, ativada pela elevação da temperatura da água do mar (Banin *et al.* 2003). No Brasil já houve vários registros desse fenômeno em sua costa, apesar de ainda não haver uma correlação com infecções causada por agentes microbianos (Migotto 1997; Leão *et al.* 2008). Nos últimos 30 anos houve um aumento significativo no número de registros de corais branqueados nos três maiores oceanos (Glynn 1991).

Apesar de muitos pesquisadores já terem estudado a palitoxina, uma potente neurotoxina encontrada em colônias de *P. caribaeorum*, sua origem microbiana ainda é uma questão em aberto. No Brasil, o estudo da microbiota associada a cnidários ainda está no início, e além de se restringirem a poucas espécies de corais, a maioria está concentrada nos estados de São Paulo e da Bahia (Chimetto *et al.* 2009; Reis *et al.* 2009).

Este estudo teve como objetivo analisar a microbiota cultivável associada ao muco de colônias saudáveis e branqueadas do zoantídeo *P. caribaeorum* no litoral de Pernambuco, uma vez que essa espécie é dominante nos ambientes recifais pernambucanos e agrega propriedades farmacológicas no seu muco (Soares *et al.* 2006). Para entender melhor a natureza dessas propriedades, o primeiro passo é avaliar a diversidade de bactérias associadas a este animal. Além disso, a diversidade encontrada pode ser utilizada como um bioindicador de estresses ambientais. Esta pesquisa fornece subsídios para que estudos futuros tenham capacidade de entender melhor a biologia dessas bactérias, de seu hospedeiro e de todos seus desdobramentos.

1.2 Objetivos

1.2.1. Objetivo geral

- Caracterizar taxonomicamente a microbiota do muco de *Palythoa caribaeorum* do litoral sul de Pernambuco baseado em sequências dos genes 16S rDNA;

1.2.2. Objetivos específicos

- Usar as sequências do genoma das bactérias heterotróficas do muco de *P. caribaeorum*, aliada às plataformas de bioinformática, como ferramentas de identificação taxonômica desta comunidade biológica;
- Identificar a diversidade isolada do muco coletado de colônias saudáveis e branqueadas de *P. caribaeorum* em duas localidades distintas;
- Determinar possíveis agentes patogênicos das colônias branqueadas;
- Identificar bactérias que apresentem potencial para aplicações biotecnológicas futuras.

1.3 Revisão da Literatura

1.3.1. O Filo Cnidaria, a Ordem Zoanthidea e *Palythoa caribaeorum*

O filo Cnidaria compreende dois clados monofiléticos, Anthozoa e Medusozoa, que são bem definidos por características dos seus ciclos de vida, de suas anatomias, e por seus genomas. A origem do termo Cnidaria vem do grego *knidos* (urticante), por todos os integrantes do grupo apresentarem cnidas, organelas dispostas de um longo filamento com espinhos retráteis e substâncias tóxicas, utilizadas para sua defesa e captura de presas. O clado Medusozoa inclui as classes Cubozoa, Scyphozoa, Hydrozoa e Staurozoa, que são representadas por indivíduos que podem apresentar uma fase medusóide em pelo menos alguma fase do seu ciclo de vida (Marques & Collins 2004). O clado Anthozoa é representado por duas subclasses, Octocorallia e Hexacorallia. Esta última compreende animais como os corais escleractínios formadores dos recifes, os corais negros, as anêmonas-do-mar e os zoantídeos (Daly *et al.* 2007).

Os membros da Ordem Zoanthidea são exclusivamente marinhos, semelhantes aos corais por serem coloniais, sésseis e bentônicos, mas não apresentam um exoesqueleto de carbonato de cálcio, característico dos corais. Os pólipos apresentam duas fileiras de tentáculos marginais e o arranjo dos mesentérios é único entre os hexacorais (Ryland & Lancaster 2003). *Palythoa caribaeorum* Duchassaing & Michelotii, 1860 (Figura 1) é um zoantídeo comum nos recifes do Caribe e do Brasil, onde apresenta uma ampla distribuição geográfica, que vai do litoral do Estado do Ceará até Santa Catarina, além de também ocorrer no Atol das Rocas, nos arquipélagos de Fernando de Noronha, São Pedro e São Paulo, Abrolhos, e na Ilha Trindade (Neves *et al.* 2002). Esta espécie atinge no máximo 15 metros de profundidade, sobretudo pela sua dependência da luz em virtude da presença das zooxantelas em seus tecidos (Sebens 1982). O zoantídeo *P. caribaeorum* apresenta os pólipos conectados por um espesso tecido (cenênquima) que agrega partículas minerais na sua parede e é conhecido popularmente como “baba-de-boi”, por secretar, em condições de maré baixa, um muco protetor bastante viscoso sobre a superfície da colônia.



Figura 1 – Colônias saudáveis de *Palythoa caribaeorum* de Porto de Galinhas-PE (Fotos: Liany Melo).

Em Pernambuco, *P. caribaeorum* ocupa extensas áreas dos ambientes recifais da zona de entre-marés formando grandes tapetes sobre o substrato duro e estabelecendo associações com diversos outros taxa, como Mollusca, Crustacea, Nematoda e Polychaeta (Pérez *et al.* 2005). A predominância deste organismo em muitos recifes pode ser explicada por sua alta tolerância a estresses ambientais (Sebens 1982), por sua alta capacidade reprodutiva (Acosta & Asbahr 2000) e por produzirem uma potente toxina não-protéica, a palitoxina (Seemann *et al.* 2009). Estas características tornam *P. caribaeorum* um forte competidor por espaço com outros organismos bentônicos presentes nos recifes de corais, como as esponjas, os corais, os hidróides calcários, as gorgônias e as ascídias (Moore & Scheuer 1971; Suchanek & Green 1981; Acosta 2001).

1.3.2. Os Recifes de Corais

Os recifes de corais constituem o mais diverso, o mais complexo e o mais produtivo ecossistema marinho costeiro suportando uma vasta diversidade de peixes e invertebrados (Connell 1978). A unidade fundamental desses ecossistemas são os corais zooxantelados por depositarem carbonato de cálcio formando uma complexa estrutura física que proporciona recursos e condições de sobrevivência para milhões de espécies marinhas (Souter & Lindén 2000). Os recifes abrigam uma enorme diversidade de peixes bentônicos, de organismos bentônicos sésseis (corais, esponjas e algas), de organismos da criptofauna

que vivem sob o substrato (poliquetos, sipúnculos e bivalves), de organismos incrustantes sésseis que realizam a bioerosão (esponjas, equinodermos, tunicados, briozoários), entre outros. Apenas um dos 33 filos que existem no planeta não ocorre nos recifes de corais e 15 só ocorrem nesses ecossistemas (Norse 1993).

Além da importância ecológica dentro dos oceanos por abrigarem uma enorme diversidade, os recifes de corais ainda contribuem diretamente para a economia de muitos países em todo o mundo. Eles suportam a indústria pesqueira, o turismo e o desenvolvimento emergente de produtos naturais através da indústria biotecnológica nesses países, além de proteger suas costas de desastres naturais (Bourne *et al.* 2009).

Esses ecossistemas provêm uma complexa estrutura ambiental de habitats suportando uma ampla diversidade microbiana que influencia desde a fisiologia dos organismos recifais, até os processos ecológicos e biogeoquímicos. Entre estes se destacam, a cadeia alimentar, o ciclo de vida dos organismos marinhos, o ciclo dos nutrientes e fatores que influenciam na resiliência dos ecossistemas recifais, como o recrutamento larval e a colonização (Ainsworth *et al.* 2009).

No Brasil, os principais ambientes recifais são distribuídos da costa do estado do Maranhão até o Sul do estado da Bahia, além do Parcel Manuel Luiz, do Arquipélago de São Pedro e São Paulo, do Atol das Rocas e do Arquipélago de Fernando de Noronha (Leão *et al.* 2003). Os recifes brasileiros são considerados uma área prioritária para a conservação da biodiversidade no Oceano Atlântico, porque embora apresente um pequeno tamanho (5% dos recifes do Atlântico), possui uma alta taxa de endemismo de suas espécies de corais (Moura 2003).

Não obstante toda a importância agregada a esses ecossistemas, eles vêm sendo fortemente impactados em consequências de ações antrópicas. Levantamentos recentes mostram que aproximadamente 20% dos recifes de corais do mundo já foram destruídos (Wilkinson 2008) e que um terço das espécies de corais está em risco de extinção (Carpenter *et al.* 2008). O estado futuro desses recifes será determinado pela habilidade do ecossistema em responder ao aumento dos distúrbios ambientais enquanto permanece em um sistema dominado por corais (Hughes *et al.* 2003).

Estresses como resultado do aumento da influência antropogênica sobre as regiões costeiras adjacentes aos recifes podem levar à mudanças nas comunidades microbianas, com efeitos adversos sobre a saúde dos corais (Ritchie & Smith 1995). Uma das principais causas apontadas da degradação dos recifes são as doenças infecciosas causadas por microrganismos (Richardson & Aronson 2002). Em virtude disso, nos últimos anos muitos

estudos têm focado a ecologia microbiana dos corais para entender a influência dos microrganismos na saúde e na promoção de doenças nestes animais.

1.3.3. O muco dos corais

As células glandulares da ectoderme dos corais secretam um muco cuja composição varia de acordo com a espécie (Ducklow & Mitchell 1979). A composição deste muco consiste de várias proporções de proteínas, lipídios e polissacarídeos. Também são considerados componentes do muco, as zooxantelas, os microrganismos, as cnidas, as algas filamentosas e as partículas de sedimento (Brown & Bythell 2005). Entre as suas principais funções, o muco serve para manter as colônias limpas de sedimento (Hubbard & Pocock 1972), proteger os animais contra os raios ultravioleta e a dessecação, capturar alimento (Kellogg 2004; Kalimutho *et al.* 2007; Lewis & Price 1976).

Esta camada mucosa presente nos corais é freqüentemente exposta a uma variedade de estresses ambientais, como exposição ao ar, invasão microbiana e sobrecarga de sedimento e de poluentes (Peters 1981; Coffroth 1983; Frias-Lopez *et al.* 2002). Nestas condições adversas, o papel do muco dos corais é proteger e lubrificar sua superfície, prevenindo o epitélio da dissecação e de possíveis infecções (Jatkar *et al.* 2010). A produção, a liberação e o subsequente consumo do muco dos corais consistem em um mecanismo de transferência de energia dos corais e de suas algas endossimbióticas para outros organismos recifais (Ducklow & Mitchell 1979).

O muco secretado pelos corais abriga representantes dos três domínios da vida, Archaea, Eubacteria e Eukarya (Kellogg 2004; Wegley *et al.* 2007). A comunidade microbiana presente neste biofilme chega a exceder tanto numericamente, como metabolicamente, a comunidade da água do mar (Ritchie 2006). O coral holobionte, termo proposto por Rohwer *et al.* (2002), consiste de uma simbiose entre o animal coral, algas endossimbióticas, conhecidas por zooxantelas, e uma grande diversidade de microrganismos como bactérias, archaea, fungos e vírus. Estes organismos formam um complexo simbiote, onde há uma estreita relação entre seus integrantes e qualquer distúrbio nesse padrão afeta a saúde do hospedeiro.

Como ilustração, o composto dimetil-sulfoniopropinato (DMSP) produzido em altas concentrações pelas zooxantelas provê nutrientes para as bactérias, com importantes consequências para a saúde dos corais (Raina *et al.* 2009). Comparações entre os microrganismos presentes no muco, nos espaços intracelulares do tecido e na matriz esquelética dos corais mostram que cada comunidade é distinta (Ainsworth *et al.* 2009),

assim como cada espécie de coral apresenta uma comunidade microbiana específica (Rohwer *et al.* 2002).

Enquanto o estudo da microbiota associada ao muco de várias espécies de corais já foi objeto de estudo de outros autores, o conhecimento acerca das associações entre os microrganismos e o muco de zoantídeos ainda é incipiente.

1.3.4. Os Microorganismos marinhos

Os oceanos representam um dos mais significantes e menos compreendidos, ambientes naturais habitados por microrganismos do planeta (Martin-Cuadrado *et al.* 2007). A associação entre os microrganismos e algumas espécies de corais tem sido objeto de estudo de alguns autores, através da análise genômica destes microrganismos (Bourne & Munn 2005; Koren & Rosenberg 2006; Wegley *et al.* 2007; Reis *et al.* 2009).

Os organismos marinhos habitantes dos recifes são uma interessante fonte para a descoberta de novas linhagens de espécies de bactérias (Kurahashi & Yokota 2002). Como parte dos esforços para isolar bactérias de invertebrados marinhos, várias espécies novas de bactérias foram identificadas através da análise de seqüências do gene 16S rRNA (Fukunaga *et al.* 2006). Porém, a maior parte dos estudos publicados tem isolado bactérias a partir do sedimento marinho e da água do mar e não dos organismos marinhos (Sfanos *et al.* 2005).

A diversidade procariótica apresenta enormes possibilidades de recursos genéticos e biológicos que podem ser explorados para a descoberta de novos genes, de vias metabólicas completas e de seus produtos (Cowan 2000). Apesar dos microrganismos exercerem um papel fundamental por mediarem o fluxo da matéria e da energia nos oceanos, sua real diversidade e potenciais funções permanecem pouco conhecidas (Delong & Karl 2005).

As bactérias representam um grupo taxonomicamente diverso, biologicamente ativo e que coloniza todos os habitats marinhos, das profundezas dos oceanos aos estuários de águas rasas. Dados compilados até o ano de 2006 revelam que apenas 4500 espécies de bactérias já haviam sido descritas até aquele ano, contrastando com as mais de um milhão de espécies eucarióticas já descritas (Konstantinidis *et al.* 2006). Esse dado demonstra o quanto ainda é incipiente os campos da taxonomia e da sistemática de bactérias.

As comunidades de bactérias que habitam os corais saudáveis diferem do bacterioplâncton ao redor deles na água do mar e são distintas entre as diferentes espécies de corais (Frias-Lopez *et al.* 2002; Rohwer *et al.* 2002). Estes autores concluíram que diversas sequências detectadas na água do mar, e em muco de corais saudáveis, doentes e

mortos já haviam sido reportadas em seres humanos. Algumas comumente encontradas em esgotos de origem humana, outras conhecidas por serem patógenos de organismos marinhos e terrestres, e outras são derivadas do solo nos continentes. Também foi mostrado que a comunidade de bactérias muda quando os corais estão branqueados ou quando apresentam alguma doença (Ritchie & Smith 1995).

O papel dos microrganismos e suas interações com os organismos recifais estão apenas começando a ser elucidados. Mas se acredita que as bactérias têm um importante papel fisiológico e ecológico dentro dos ecossistemas recifais principalmente relacionados a nutrição e a defesa (Coffroth 1990; Ritchie 2006). Algumas espécies de corais contêm bactérias que são capazes de fixar o nitrogênio quando a concentração de oxigênio intracelular está baixa (Lesser *et al.* 2004) e outras possuem bactérias produtoras de antibióticos que combatem os patógenos oportunistas (Ritchie 2006). Entender como a associação entre os microrganismos e os organismos marinhos muda ao longo do tempo é a chave para entender a saúde dos ecossistemas recifais (Bourne & Munn 2005).

Diversos constituintes da comunidade microbiana associada ao muco são capazes de proteger os corais da invasão de potenciais patógenos (Rohwer *et al.* 2002). Entre estes antagonistas de patógenos de corais, algumas espécies de *Vibrio*, *Photobacterium*, *Bacillus* e *Halomonas* já foram recentemente identificadas (Ritchie 2006). Mudanças na microbiota normal, antes de sinais de estresses visíveis nas colônias, podem ser usadas como bioindicadores de doenças ambientais (Pantos *et al.* 2003). A predominância de espécies de γ -Proteobacteria, como *Vibrio*, *Cytophaga-Flavobacterium* e de bactérias redutoras de sulfato podem ser indicativos de poluição orgânica (Das *et al.* 2006).

1.3.5. Técnicas de cultivo em laboratório

Metodologias de cultivo e independentes de cultura têm sido empregadas para investigar as bactérias associadas aos corais (Disalvo & Gundersen, 1971; Rohwer *et al.* 2001; Bourne & Munn, 2005; Chimetto *et al.* 2008). O primeiro estudo independente de cultivo de bactérias associadas a corais revelou uma alta diversidade no complexo holobionte, incluindo uma maioria de novas espécies (Rohwer *et al.* 2001; Rohwer *et al.* 2002). Contudo, métodos baseados em cultivo também têm documentado com sucesso comunidades de bactérias associadas a corais saudáveis, branqueados e doentes (Ritchie & Smith 1995; Chimetto *et al.* 2008). Esses estudos têm demonstrado a importância das bactérias associadas aos corais na nutrição e na resposta a estresses (Sorokin 1973; Ducklow & Mitchell 1979).

Rohwer *et al.* (2001) foram os pioneiros a aplicar conjuntamente técnicas dependentes e independentes de cultivo, em estudos de diversidade bacteriana associada a corais. Através do sequenciamento do gene 16S rRNA foi encontrado que 30% das bactérias foram similares a indivíduos de Cyanobacteria e de α -Proteobacteria. Por outro lado, entre as bactérias cultiváveis foi visto uma dominância de espécies de *Pseudoalteromonas* e de *Vibrio*. Este estudo revelou a importância da complementaridade entre ambas as técnicas e concluíram que mais de 50% das sequências obtidas foram menos que 63% similares as seqüências dos bancos de dados.

Os principais grupos de bactérias marinhas associadas ao muco e ao tecido de corais identificados até o momento através dessas técnicas são: Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Planctomycetes, Actinomycetes e Cyanobacteria (Rohwer *et al.* 2001; Frias-Lopez *et al.* 2002; Bourne & Munn 2005).

1.3.6. Doença em corais e zoantídeos

As doenças de corais são definidas como uma condição que causa injúrias as suas funções vitais geralmente ocasionando mortalidade total ou parcial provocadas por fatores abióticos (aumento da temperatura da água do mar) ou por fatores bióticos (infecções mediadas por microrganismos) (Sutherland *et al.* 2004). As doenças de corais têm sido estudadas desde a década de 80 e são consideradas um importante fator no recente declínio dos recifes de corais em todo o mundo, principalmente pela ação de importantes patógenos infecciosos que ocorrem nos oceanos (Harvell *et al.* 1999).

As regiões do Caribe e do Indo-Pacífico são áreas bastante afetadas por essas doenças, devido ao aumento da virulência, da rápida disseminação dos patógenos, ao aumento do número de espécies afetadas e ao surgimento de novas doenças (Green & Bruckner 2000; Kaezmarsky 2006). Entre 18 a 30 doenças e síndromes de corais são descritas ao redor do mundo, com base em características macroscópicas (Weil *et al.* 2006). O diagnóstico dessas doenças é primariamente macroscópico, levando em conta características como extensão da perda do tecido, cor do tecido e exposição do tecido do coral. Estes sintomas das doenças são a base para nomenclatura e a diagnose das mesmas (Ainsworth *et al.* 2007).

Os microrganismos patogênicos podem ser classificados de duas formas diferentes, os primários e os oportunistas. O patógeno primário é o primeiro infectante em um hospedeiro e o oportunista é o que causa uma infecção subsequente por multiplicação dentro do tecido que já se apresentava doente em consequência da infecção causada pelo patógeno primário. Condições de estresses ambientais e de poluição podem desestabilizar o

coral holobionte, criando condições favoráveis para os patógenos oportunistas afetarem o coral estressado. Um patógeno oportunista pode ser definido por um organismo que é normalmente comensal, mas que pode causar uma infecção em um hospedeiro já estressado (Ainsworth *et al.* 2007).

Além dos corais, algumas doenças já foram reportadas em outros cnidários, como alcionáceos (Santavy & Peters 1997) e gorgônias (Richardson 1998). Contudo, apenas o branqueamento (Migotto 1997), um crustáceo parasita (Grygier 1985) e uma doença que afeta os pólipos de *P. caribaeorum* no estado de São Paulo (Acosta 2001) são conhecidos por afetar zoantídeos. Acosta (2001) descreveu pela primeira vez uma doença registrada em colônias de *P. caribaeorum*. O autor observou que os sintomas da doença são o inchamento, a retração e a perda da coloração dos pólipos e de todo o cenênquima ao redor, além da diminuição da produção de muco e do destacamento natural do seu substrato. Por análise microscópica foi verificada uma grande abundância de vibrios, fungos e outros microrganismos nos tecidos afetados. O autor especula que este patógeno deve ser espécie-específica de *P. caribaeorum*, uma vez que não afetou nenhuma outra espécie de zoantídeo ou de coral da área estudada, e que a elevação da temperatura deve ser o fator primário da presença ou ausência do patógeno, assim como durante o fenômeno do branqueamento.

Francini-Filho *et al.* (2008) registraram pela primeira vez no Brasil seis tipos de doenças observadas nos recifes de Abrolhos, sul da Bahia, causadas por bactérias e fungos. Todas elas já haviam sido descritas nas regiões do Caribe e do Indo-Pacífico, são elas, *white plague*, *black-band* (Figura 2), *red-band*, *dark spot*, aspergilose e necrose do tecido de octocorais. A *black band disease* (BBD) é considerada uma das principais doenças que impactam os recifes de corais de todo o mundo, especialmente em ambientes poluídos e na região do Caribe (Al-Moghrabi 2001). Ela é formada por um complexo dominado por cianobactérias e por bactérias que reduzem e oxidam o enxofre, além de outros microrganismos (Carlton & Richardson 1995).

Essas doenças afetam algumas espécies de corais e octocorais endêmicas do Brasil, inclusive espécies que só ocorrem no sul da Bahia, como *Favia leptophylla*, *Mussismilia braziliensis* e *Plexaurella regia*. Segundo Francini-Filho *et al.* (2008), essas doenças apenas agora começam a afetar os recifes brasileiros, devido ao efeito sinérgico de múltiplos agentes estressores, como elevação da temperatura da água do mar, aumento da poluição e da eutrofização das águas costeiras, e da introdução de microrganismos terrestres no ambiente marinho (Harvell *et al.* 1999). Nos últimos anos, no estado da Bahia tem ocorrido uma aceleração da urbanização, da agricultura em larga-escala e da destruição da Mata

Atlântica, causando o aumento da erosão costeira (Leão *et al.* 1997; Costa *et al.* 2000). Esses fatores causam um influxo de sedimento de origem terrestre para a região de Abrolhos aumentando o número de microrganismos contaminantes conhecidos por serem os principais patógenos de corais.

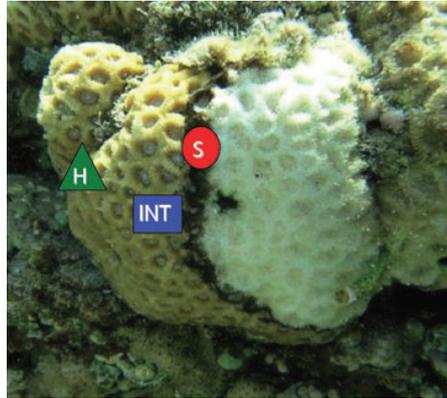


Figura 2 – Colônia afetada pela *black band disease* (o triângulo corresponde a área saudável; o quadrado a região de interface; e o círculo a área doente) (adaptado de Barneah *et al.* 2007)

Algumas sequências de bactérias detectadas no muco de corais são relacionadas com microrganismos conhecidos por serem patógenos de seres humanos. Por exemplo, sequências relacionadas aos gêneros de bactérias *Campylobacter* e *Arcobacter* presentes em bibliotecas genômicas do muco de corais mortos e doentes são grupos importantes da flora bacteriana humana. Bactérias da família *Campylobacteraceae*, é um grupo diverso de bactérias Gram-negativas comensais e patogênicas que colonizam as superfícies mucosas do trato intestinal, a cavidade oral e o trato urogenital em humanos e de outros hospedeiros animais (Vandamme & De Ley 1991). E espécies de *Arcobacter* são conhecidas por serem patógenos intestinais que causam cólicas abdominais em crianças (Van Damme *et al.* 1992).

A comunidade procariótica associada a corais saudáveis pode diferir muito dos corais doentes (Ritchie & Smith 1995). Impactos ambientais como a poluição na costa oriunda da descarga de esgotos pode afetar a composição destas comunidades (Klaus *et al.* 2007). A eutrofização do ambiente costeiro pode levar a proliferação de espécies de *Vibrio* que são os principais patógenos de peixes e de invertebrados marinhos, incluindo os corais (Rosenberg *et al.* 2007). A descarga de esgoto pode aumentar a absorção de nitrogênio pelos corais e, assim, induzir mudanças nas comunidades microbianas associadas. Por exemplo, as doenças *black-band* e *white plague* podem estar associadas a contaminação fecal de origem humana (Frias-Lopez *et al.* 2002; Patterson *et al.* 2002). Portanto é

importante comparar as comunidades dos corais para identificar possíveis ligações entre a diversidade e a poluição costeira (Arboleda & Reichardt 2009).

Examinando comunidades bacterianas de quatro ilhas do Pacífico, Dinsdale *et al.* (2008), encontraram diferenças significativas tanto na abundância como na capacidade metabólica das comunidades de cada local. Apesar das ilhas serem oceanograficamente distintas, a grande diferença na função metabólica dessas bactérias, indica que a proximidade das populações humanas e os distúrbios ambientais locais, influenciam a diversidade de bactérias e o seu metabolismo, e como resultado, influenciam a saúde dos ecossistemas recifais.

1.3.7. O branqueamento em corais e zoantídeos

O fenômeno do branqueamento consiste na quebra da simbiose entre o organismo hospedeiro e as microalgas fotossintetizantes endossimbiontes (zooxantelas). O branqueamento do coral é resultado de uma redução na densidade das zooxantelas no tecido gastrodérmico desses animais e/ou da diminuição dos pigmentos fotossintéticos nas células das microalgas (Gates *et al.* 1991) (Figura 3). A perda das zooxantelas afeta diretamente os hospedeiros porque elas suprem em cerca de 60% os nutrientes dos corais (D'Elia *et al.* 1991).



Figura 3. Colônias branqueadas de *Palythoa caribaeorum* de Porto de Galinhas-PE (Fotos: Liany Melo).

O branqueamento tem sido relacionado com o aquecimento global, e em algumas instâncias, com bactérias que aumentam a sua virulência às altas temperaturas (Rosenberg & Bem-Haim 2002). Em várias partes do mundo, o fenômeno do branqueamento coincide com o aquecimento dos oceanos durante os eventos do El-Niño, evidenciando que a elevação da temperatura da água do mar afeta diretamente os recifes de corais, inclusive na região Sudeste do Brasil, onde foi registrado o fenômeno do branqueamento em massa em

várias colônias do coral *M. hispida* e do zoantídeo *P. caribaeorum* (Brown & Ogden 1993; Migotto 1997). Nos últimos 30 anos, houve um aumento significativo no número de registros de corais branqueados nos três maiores oceanos (Glynn 1991; Hoegh-Goldberg & Salvant, 1995).

Outros registros desse fenômeno já foram realizados no Brasil por Mayal & Pinto (1999) que acompanharam o fenômeno no Atol das Rocas e observaram colônias de corais e de *P. caribaeorum* branqueadas; Dutra *et al.* (2000), que realizaram um monitoramento do fenômeno no litoral norte da Bahia; Castro & Pires (1999) e Oliveira *et al.* (2004), que verificaram colônias de corais branqueadas em Abrolhos, no sul da Bahia, relacionadas com o aumento da temperatura da água do mar; Leão *et al.* (2008), que observaram a ocorrência deste fenômeno em graus diferentes de intensidade em todos os recifes visitados ao longo da costa da Bahia e concluíram que nos recifes mais próximos a costa foi encontrado um percentual maior de corais branqueados em virtude da maior influência da atividade humana, como taxas maiores de sedimentação e de nutrientes na coluna d'água; Costa *et al.* (2001), Costa & Amaral (2002) e Costa *et al.* (2004), que registraram o branqueamento em corais dos estados da Paraíba e de Pernambuco; Ferreira & Maida (2006), que relataram a ocorrência do branqueamento em corais do Atol das Rocas e do Arquipélago de Fernando de Noronha e na costa pernambucana.

A maioria dos estudos desenvolvidos no Brasil limitou-se a correlacionar o fenômeno do branqueamento principalmente com o aumento da temperatura das águas oceânicas em colônias de corais e de hidróides calcários. Apenas Migotto (1997) e Mayal & Pinto (1999) observaram o branqueamento em espécies de zoantídeos, como *Palythoa caribaeorum*, *Zoanthus sociatus* e *Z. solanderi*. Os outros estudos supracitados registraram o fenômeno nas espécies de corais, *Mussismilia braziliensis*, *M. hispida*, *M. harttii*, *Siderastrea stellata*, *Montastraea cavernosa*, *Porites astreoides*, *P. branneri*, *Favia gravis*, *F. leptophylla*, *Agaricia agaricites* e *Madracis decactis*; e nas espécies de hidróides calcários, *Millepora alcicornis*, *M. braziliensis* e *M. nitida*. Apesar desses registros, ainda não foi observada uma mortalidade em massa dos corais que ocorrem no Brasil (Leão *et al.* 2008).

Bactérias do grupo dos vibrios tendem a dominar a microbiota de ambientes com altas taxas de nutrientes e com altas temperaturas, e o aquecimento global e a poluição induzem a proliferação de linhagens de vibrios potencialmente patogênicas (Eilers *et al.* 2000). Rosenberg *et al.* (2007) sugerem que os vibrios são a principal causa da morte de corais, particularmente durante o branqueamento. A espécie *V. coralliilyticus* é um importante patógeno de coral por produzir uma toxina que causa foto-inibição das zooxantelas ocasionando a lise do tecido do hospedeiro sob altas temperaturas (Sussman *et*

al. 2009). Enquanto que o agente que causa o branqueamento é formado por uma única bactéria, as doenças de corais como a *black band disease* e a *yellow band* são causadas por um consórcio de bactérias (Frias-Lopez *et al.* 2002; Cervino *et al.* 2004).

O branqueamento sazonal do coral *Oculina patagonica* no Mar Mediterrâneo é resultado da infecção provocada pela bactéria *Vibrio shiloi*. Os fatores de virulência desta bactéria surgem apenas a altas temperaturas, associados com o início do branqueamento (Banin *et al.* 2001; 2003). Utilizando o modelo *V. shiloi*-*O. patagonica* para estudar o branqueamento dos corais, foi demonstrado que o primeiro passo no processo de infecção é a adesão de *V. shiloi* aos receptores da β -galactosidase presentes no muco do coral (Toren *et al.* 1998). A temperatura de crescimento das bactérias é crítica para a adesão de *V. shiloi* ao coral. Quando a bactéria cresceu em temperaturas baixas, não houve adesão ao coral. Porém quando as bactérias cresceram a elevadas temperaturas da água do mar, elas se aderiram firmemente ao coral. Após isso, elas penetram na epiderme do coral (Figura 4) e se multiplicam no tecido onde produzem toxinas que inibem a fotossíntese das zooxantelas causando a lise dessas microalgas (Bem-Haim *et al.* 1999).

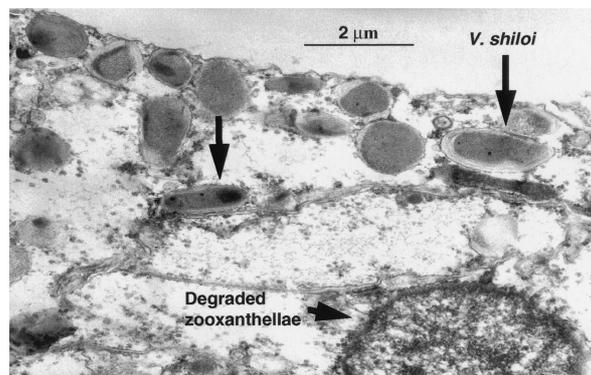


Figura 4 – Eletromicrografia de uma secção de *Oculina patagonica* infectada por *V. shiloi* (retirada de Banin *et al.* 2000).

1.3.8. Farmacologia e estudos de microbiota em *Palythoa caribaeorum*

Os cnidários usam diversos mecanismos de defesa inata para se protegerem contra a infecção por microrganismos. A primeira linha de defesa é física, utilizando o movimento dos cílios e a camada do muco secretada para prover proteção contra as infecções. O muco atua como uma barreira física para os microrganismos, que são levados através do transporte muco-ciliar para dentro dos pólipos onde são digeridos por fagocitose. A outra forma de defesa é conhecida como “hipótese do coral probiótico”, em que os corais abrigam em sua superfície uma população bacteriana não patogênica que ajuda a prevenir a

colonização e multiplicação de bactérias patogênicas, por competição e pela produção de antibióticos (Ritchie 2006; Geffen *et al.* 2009).

Vários estudos já abordaram a produção de antibióticos por invertebrados marinhos e por seus microrganismos simbiotes, especialmente em esponjas (Monks *et al.* 2002), gorgônias (Jensen *et al.* 1996) e alcionáceos (Kelman *et al.* 1998). Mas pouco é conhecido sobre a atividade antimicrobiana de corais, grupos dominantes e conspícuos de animais marinhos bentônicos, que assim como os zoantídeos, são abundantes em recifes de todo o mundo (Kelman *et al.* 2006).

Apesar da ampla distribuição geográfica de *P. caribaeorum*, pouco se sabe a respeito da microbiota associada ao seu muco. A descoberta da palitoxina em suas colônias no litoral caribenho restringiu os estudos com estes zoantídeos, direcionando a maior parte das pesquisas para este composto, e impingindo papel deletério as colônias. A palitoxina foi primeiramente isolada do zoantídeo *Palythoa toxica* e posteriormente em outras espécies de zoantídeos do gênero *Palythoa*, *Protopalythoa* e *Zoanthus*, e no dinoflagelado *Ostreopsis siamensis* (Moore & Scheuer, 1971; Ukena *et al.* 2001). Trata-se de um composto letal, não protéico (peso molecular 2.681 Da), de origem bacteriana e é considerada a molécula biologicamente ativa mais potente de origem marinha, sendo encontrada em diferentes tipos de organismos marinhos que vivem em associação com os zoantídeos, como: esponjas, gorgônias, moluscos e crustáceos, e também em espécies predadoras dos zoantídeos, tais como: poliquetos, estrelas-do-mar e peixes (Kaul *et al.* 1974; Moore & Bartolini 1981; Gleibs & Meb 1999).

A capacidade dos organismos marinhos de acumularem a palitoxina na sua cadeia alimentar eventualmente causa envenenamento de humanos por ingerirem alimentos como peixes e crustáceos (Taniyama *et al.* 2002). Frolova *et al.* (2000), baseados em resultados de imunoensaios, sugeriram a origem bacteriana de palitoxina. Através de uma triagem de 420 isolados obtidos de amostras tóxicas de *Palythoa*, linhagens das bactérias Gram-negativas dos gêneros *Aeromonas* e *Vibrio*, foram observadas como produtoras de compostos relacionados à palitoxina. Seemann *et al.* (2009) analisando a presença de bactérias hemolíticas em *P. caribaeorum* isolaram mais de 250 bactérias de clados filogeneticamente distintos dentro de Firmicutes, Gamma-Proteobacteria e Actinobacteria. Espécies como *Bacillus*, *Photobacterium*, *Pseudoalteromonas*, *Brevibacterium* e *Micrococcus*, apresentaram atividade hemolítica.

Alguns estudos já evidenciaram o potencial de espécies de zoantídeos do gênero *Zoanthus* como produtores de compostos de interesse biológico e farmacológico (Babu *et al.* 1997; Grace & Jacobs 1998; Kuramoto *et al.* 1998), mas em função da toxicidade da

palitoxina, poucos estudos abordaram *P. caribaeorum* deste ponto de vista. Durante alguns anos, amostras de *P. caribaeorum* foram coletadas no litoral sul de Pernambuco e submetidas a estudos farmacológicos. Soares *et al.* (2006) não encontraram toxicidade nas amostras coletadas e identificaram uma significativa atividade analgésica em extrato bruto hidroalcoólico deste zoantídeo em camundongos. Esses resultados corroboram com os relatos populares, principalmente de pescadores do litoral sul pernambucano, que utilizam o muco liberado pelo *P. caribaeorum* como analgésico, antiinflamatório e cicatrizante, sendo o muco aplicado diretamente sobre feridas abertas. Soares *et al.* (2006) sugerem que a ausência de toxicidade nas colônias estudadas pode justificar-se pela ausência dos microrganismos produtores da palitoxina.

1.3.9. Culturabilidade de bactérias marinhas em condições de laboratório

A maioria dos microrganismos marinhos requer complexos nutricionais e condições físicas que ainda são difíceis de serem reproduzidas em condições de cultivo em laboratório. Além disso, no ambiente os microrganismos existem em assembléias interdependentes funcionando como uma simples unidade metabólica em uma estreita interação com seu hospedeiro, cenários que também não podem ser simulados em condições de laboratório (Ainsworth *et al.* 2009). Apesar dessas limitações e da alta seletividade dos amplamente utilizados meios de cultura comerciais para bactérias heterotróficas, técnicas baseadas em cultivo continuam a ser usadas na caracterização de comunidades procarióticas que colonizam o muco dos cnidários (Ritchie & Smith 1995; Ritchie 2006; Chimetto *et al.* 2008) (Figura 5).



Figura 5 – Cultura de bactéria obtida do muco de *Palythoa caribaeorum* (Foto: Felipe Campos).

Muitas bactérias marinhas são difíceis de cultivar por causa da sua natureza oligotrófica. Para cultivar essas bactérias que não são adaptadas para crescerem em meios

de cultura ricos em nutrientes, Button *et al.* (1993) utilizaram água do mar natural como um meio de crescimento. Posteriormente, esta técnica foi aperfeiçoada, e muitas novas linhagens de microrganismos, incluindo aqueles que até então se acreditava serem “não-cultiváveis”, foram isolados e descritos, como é caso de *Paracoccus marinus* isolada da água do mar da Baía de Tóquio, Japão (Khan *et al.* 2008). Um estudo mostrou que novas espécies de bactérias Gram-positivas podem ser isoladas utilizando meios de cultivo com poucos nutrientes (Gontang *et al.* 2007).

Em um estudo de bactérias associadas a esponjas da Grande Barreira de Recifes da Austrália, foi demonstrado que dentre diversos meios utilizados, o Ágar Marinho 2216, um meio de cultivo desenvolvido por Claude ZoBell na década de 40, foi o que apresentou o melhor resultado proporcionando o maior número de morfótipos, resultando no isolamento de novas espécies de membros do grupo Actinobacteria. Diversos autores têm usado este meio de cultura para isolar bactérias marinhas heterotróficas do muco e do tecido de corais de outros invertebrados (Sfanos *et al.* 2005; Arostker *et al.* 2009; Nithyanand & Pandian, 2009; Gram *et al.* 2010).

1.3.10. Estudos de microbiota associada a corais e zoantídeos no Brasil

As poucas informações sobre as bactérias associadas aos corais do Brasil utilizando seqüências do gene 16S rRNA foram recentemente publicadas por Reis *et al.* (2009) que analisaram a diversidade de bactérias associadas ao coral endêmico do Brasil *M. braziliensis* nos recifes de Abrolhos. Os autores encontraram diversas potenciais novas espécies e os grupos Proteobacteria e Cyanobacteria como os grupos dominantes no muco desse coral. Este estudo foi importante por ter sido o primeiro sobre a microbiota deste organismo ameaçado de extinção. Chimetto *et al.* (2008) caracterizaram taxonomicamente os vibrios cultiváveis fixadores de nitrogênio do coral *M. hispida* coletados no canal de São Sebastião, São Paulo. As espécies mais abundantes no muco do coral foram *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, e em menor abundância, foram encontradas *V. campbelli* e *V. parahemolyticus*.

Chimetto *et al.* (2009) estudaram, por meio do sequenciamento do gene *pyrH*, a diversidade de bactérias do gênero *Vibrio* e *Photobacterium* do coral *M. hispida* e das espécies de zoantídeos simpátricas *P. caribaeorum*, *Protospalythoa variabilis* e *Z. solanderi* coletadas no canal de São Sebastião. Os vibrios foram dominantes no muco destas espécies e foi descoberta uma nova espécie de *Photobacterium*. Castro *et al.* (2010) caracterizaram as comunidades bacterianas associadas a colônias saudáveis e doentes do coral *M. hispida* coletados nos recifes Abrolhos, encontrando diferenças significativas entre as duas condições. Nas colônias saudáveis os grupos dominantes foram Proteobacteria,

Actinobacteria, Acidobacteria, Lentisphaerae e Nitrospira, enquanto que nos corais doentes, 70% das sequências corresponderam ao grupo Bacteroidetes.

Lins-de-Barros *et al.* (2010) descreveram a diversidade de Archaea, Bacteria e de algas eucarióticas associadas a duas espécies simpátricas de coral, *Siderastrea stellata* e *M. hispida*. Análises estatísticas mostraram que a diversidade de *S. stellata* foi maior do que em *M. hispida* e que a comunidade de Bacteria foi similar entre as duas espécies, enquanto que a comunidade de Archaea e de algas foram significativamente diferentes. Grande parte dos estudos desenvolvidos no Brasil de microbiota associada são com espécies de cnidários, especialmente os corais. Contudo, Menezes *et al.* (2010) investigaram a diversidade de bactérias e fungos associados a ascídias e esponjas. Os isolados de bactérias foram relacionados a 41 gêneros diferentes, sendo *Bacillus*, *Ruegeria*, *Micrococcus*, *Pseudovibrio* e *Staphylococcus* os mais abundantes.

CAPÍTULO 2

Bacterial diversity associated with mucus of healthy and bleached zoanthid *Palythoa caribaeorum* from littoral of Pernambuco state, Brazil.

F.F. Campos¹, J.E. Garcia¹; C.L. Luna-Finkler¹, C.C. Davolos², M.V.F. Lemos² & C.D. Pérez¹

1 Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, PE, Brasil

2 Departamento de Biologia Aplicada, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

Autor para Correspondência

Carlos Daniel Pérez, Rua Alto do Reservatório, s/n. Núcleo de Biologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco. Bela Vista, Vitória de Santo Antão, Pernambuco, Brasil – CEP: 55608-680.

e-mail: cdperez@ufpe.br

Artigo a ser submetido ao Journal of Applied Microbiology

2.1. Resumo

Palythoa caribaeorum é um zoantídeo que apresenta os pólipos inseridos em um espesso tecido que agrega partículas minerais e é comum nos recifes costeiros do Brasil. É conhecido popularmente como “baba-de-boi” por secretar, em condições de maré baixa, um muco bastante viscoso. O muco secretado por corais, animais filogeneticamente próximos aos zoantídeos, tem como funções: proteger a colônia contra os raios ultravioleta e a dessecação, atuar como substrato para o crescimento de microrganismos e produzir antibióticos que defendam o animal de patógenos. Foi analisada a diversidade de 50 amostras de bactérias originadas do muco de colônias sudáveis e branqueadas, através do sequenciamento do gene 16S rDNA. O grupo dominante foi γ -Proteobacteria com 36 isolados, seguido de α -Proteobacteria e de Actinobacteria com seis isolados cada, e de Firmicutes com dois isolados. O gênero *Vibrio* foi o melhor representado com 24 dos 50 isolados obtidos. Onze espécies tiveram índice de similaridade nucleotídica $\geq 96\%$ com as seqüências depositadas no *GenBank*, entre elas *Alcanivorax diseolei*, bactéria com grande interesse biotecnológico por degradar derivados do petróleo. É necessário que se intensifique estudos de diversidade microbiana neste zoantídeo para entender melhor o papel destas bactérias nas propriedades do muco, buscando conhecer por completo toda a diversidade associada a essa espécie.

2.2. Abstract

Palythoa caribaeorum is a cnidarian anthozoan of the Order Zoanthidea that has its polyps inserted in a thick tissue that assembles mineral particles, and is usual in coastal reefs in Brazil. It is also referred to as “baba-de-boi” due to its expelling, in a low tide condition, a very viscous mucus. The mucus expelled by corals, animals that are phylogenetically similar to zoanthids, has the function of: providing protection to the colony against ultraviolet rays and avoid desiccation; acting as a substrate to the further growth of microorganisms; and producing antibiotics that defend the animal against pathogen. This mucus is an array formed mainly by polysaccharide and proteins, and it contains Archaea, Eubacteria and Eukarya samples. It was analyzed 50 samples of bacteria originated from healthy and bleached colonies through the sequencing of 16S rDNA gene (41 sequences of healthy colonies and 9 sequences of bleached colonies). The prevailing group was γ -Proteobacteria with 36 isolates (72%), followed by α -Proteobacteria and Actinobacteria with six isolates (12%) each, and Firmicutes with two isolates (4%). The *Vibrio* genus had the highest represented, with 24 of the 50 isolates collected, corroborating previous works in which this genus was the most common bacteria group associated to the corals studied. Eleven species had nucleotide similarity index $\geq 96\%$ with the sequences deposited on *GenBank*, among them the *Alcanivorax diezeolei*, a bacteria with a high biotechnological interest due to its degradation of oil related material. It is necessary that the studies about microbiota diversity in this zoanthid gets even more intense in order to know better the role played by these bacteria on the mucus properties, aiming the fully understanding of every diversity associated to this specie.

2.3. INTRODUÇÃO

Os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais produtivos e diversos dentre os ambientes costeiros das regiões tropicais (Cortés & Jiménez 2003). O bioma dos recifes exerce um papel importante na manutenção do equilíbrio dos oceanos, além de contribuírem para a economia de vários países em todo o mundo em decorrência de atividades como a pesca e o ecoturismo (Bourne *et al.* 2009). No Brasil os principais ambientes recifais são distribuídos da costa do estado do Maranhão até o Sul do estado da Bahia, além do Parcel Manuel Luís, do Arquipélago São Pedro e São Paulo, do Atol das Rocas e do Arquipélago de Fernando de Noronha (Leão *et al.* 2003).

Os recifes em todo o mundo estão em declínio como resultado do efeito sinérgico de múltiplos agentes estressores, como o aumento da temperatura da água do mar, a degradação costeira e a poluição (Pandolfi *et al.* 2003). Esses estresses de origem antropogênica podem causar um desequilíbrio na delicada associação entre o animal coral e os microrganismos, que inclui os dinoflagelados simbiotes (zooxantelas), fungos, protozoários, bactérias, Archaea e vírus. Este complexo de organismos vivendo em íntima associação é conhecido por coral holobionte (Rohwer *et al.* 2002). Mudanças na composição da comunidade bacteriana podem afetar a saúde dos corais e aumentar a suscetibilidade do hospedeiro a doenças (Ritchie 2006).

Os zoantídeos são cnidários, filogeneticamente próximos ao grupo dos corais, abundantes em muitos recifes de corais de todos os oceanos (Ryland & Lancaster 2003). A espécie *Palythoa caribaeorum* é um zoantídeo comum nos recifes brasileiros, inclusive em Pernambuco, onde formam grandes tapetes sobre os recifes, estabelecendo associações ecológicas com organismos de diversos taxa, sendo conhecido por secretar grande quantidade de muco e por isso leva o nome popular de “baba-de-boi” (Pérez *et al.* 2005). O muco secretado por *P. caribaeorum* é muito viscoso e secretado em maior abundância do que nos corais.

A quantidade e a composição do muco produzido podem variar significativamente entre as diversas espécies de cnidários. Dentre outras funções, o muco mantém as colônias limpas de sedimento, sua viscosidade contribui para a captura de presas, além de prover substrato para o crescimento de microrganismos (Hubbard & Pocock 1972; Lewis & Price 1976; Herndl & Velimirov 1986). As características metabólicas das comunidades microbianas refletem nos compostos encontrados no muco dos corais, onde a concentração de proteínas e polissacarídeos é alta, a de lipídeo é baixa e a de aminoácidos é variável (Wild *et al.* 2004).

A microbiota associada ao muco é taxonomicamente e funcionalmente diversa e difere da microbiota do tecido do coral e da água do mar em volta das colônias (Ritchie 2006). A estrutura das comunidades de bactérias do muco dos corais é controlada por receptores específicos que se ligam as bactérias através de sinalização na superfície do muco dos corais (Kvennefors *et al.* 2008). O muco atua como uma barreira seletora para bactérias durante a colonização desta camada selecionando as bactérias que serão incorporadas ao tecido do animal.

O papel dos microrganismos nas colônias de corais saudáveis ainda não é bem compreendido, mas acredita-se que uma das funções possa ser prover proteção aos cnidários contra patógenos através da competição interespecífica e da produção de antibióticos, além de também suprir os corais com nutrientes não providos pelas zooxantelas, como nitrogênio e fósforo (Sorokin 1973; Rohwer *et al.* 2002; Rosenberg *et al.* 2007). Os recursos genéticos das bactérias associadas aos corais são vastos. Wegley *et al.* (2007) propuseram algumas funções para os genes de bactérias que habitam o coral *Porites astreoides*. Os autores destacaram genes de bactérias heterotróficas que utilizam complexos de compostos de carbono, como proteínas e polissacarídeos, genes envolvidos na fixação do carbono e do nitrogênio, e genes que participam de respostas a virulência e a estresses, em particular, no reparo do DNA e na resistência a antibióticos.

As doenças infecciosas são uma das principais causas da perda de diversidade de espécies de corais (Richardson & Aronson 2002). Dessa forma o número de estudos sobre a ecologia microbial dos corais cresceu muito nos últimos 12 anos e têm focado no papel que as bactérias exercem na prevenção e na promoção de doenças em corais (Kellogg 2004; Dinsdale *et al.* 2008; Castro *et al.* 2010).

O branqueamento dos corais tem sido relacionado ao aquecimento global e vêm sendo considerado como uma das principais ameaças dos recifes dos oceanos Índico e Pacífico. As altas temperaturas promovem o branqueamento por aumentar a virulência de algumas espécies de bactérias. O branqueamento sazonal do coral *Oculina patagonica* no Mar Mediterrâneo é resultado do aumento dos fatores de virulência da bactéria *Vibrio shiloi* (Banin *et al.* 2003).

Segundo Wegley *et al.* (2007) métodos de cultivo e independentes de cultivo têm provido informações importantes sobre a diversidade e biogeografia dos microrganismos associados aos corais, porém, ainda há muitos aspectos a serem compreendidos, como a especificidade dessas associações, a dinâmica e sucessão dessas comunidades microbianas, seus agentes patogênicos, potenciais metabólicos, etc. Por isso a

caracterização genômica dos cnidários e de todos seus microorganismos simbiotes tem sido recomendada (Rosenberg *et al.* 2007).

O primeiro estudo de diversidade bacteriana associada a corais no Brasil foi realizado por Reis *et al.* em 2009. Os autores analisaram, por meio de sequências de nucleotídeos do gene 16S rRNA, a microbiota associada ao coral endêmico do Brasil *Mussismilia braziliensis* nos recifes de Abrolhos, sul da Bahia, e identificaram a predominância dos grupos Proteobacteria e Cyanobacteria, além de diversas novas espécies putativas. A partir desse, outros estudos foram desenvolvidos.

Chimetto *et al.* (2008) caracterizaram taxonomicamente os vibrios cultiváveis fixadores de nitrogênio do coral *M. hispida* coletado no canal de São Sebastião-SP, e Chimetto *et al.* (2009) estudaram, por meio do sequenciamento do gene *pyrH*, a diversidade de bactérias do gênero *Vibrio* e *Photobacterium* do coral *M. hispida* e de espécies de zoantídeos simpátricas coletadas no mesmo local. Castro *et al.* (2010) caracterizaram as comunidades bacterianas associadas a colônias saudáveis e doentes do coral *M. hispida* coletados nos recifes Abrolhos, encontrando diferenças significativas entre as duas condições. Além desses estudos de diversidade, algumas espécies novas já foram isoladas e descritas a partir de cnidários estudados no Brasil (Chimetto *et al.* 2011; Gomez-Gil *et al.* 2011).

O zoantídeo *P. caribaeorum* é conhecido por produzir um composto não protéico de origem bacteriana chamado palitoxina (Moore & Bartolini 1981). A descoberta da palitoxina neste zoantídeo restringiu os estudos com estes animais, direcionando todas as pesquisas para este composto, e impingindo papel deletério às colônias. Apesar da alta toxicidade deste composto, há poucos estudos de diversidade bacteriana associada a esta espécie. Contraditoriamente, Soares *et al.* (2006) não verificaram toxicidade relevante em amostras coletadas nos recifes da praia de Porto de Galinhas, Pernambuco. Há relatos da população nativa desta região, de utilizarem colônias de *P. caribaeorum* diretamente sobre feridas, pois o muco deste animal tem aplicações antiinflamatórias, analgésicas e cicatrizantes.

O objetivo deste estudo foi caracterizar a diversidade das comunidades de bactérias cultiváveis associadas ao muco do zoantídeo *P. caribaeorum* de colônias aparentemente normais (saudáveis) e branqueadas (pálidas, parcialmente ou totalmente branqueadas), através do sequenciamento do gene 16S rDNA.

2.4. MATERIAIS E MÉTODOS

2.4.1. Localidades e condições de coleta

As coletas foram realizadas durante períodos de maré baixa nos recifes de Porto de Galinhas (praia muito turística, com grande ação antrópica, elevada abundância de zoantídeos e forte competição) (8°30'20" S; 35°00'34" W), Município de Ipojuca, e de Suape (área portuária com grande dominância da espécie) (8°21'46" S; 34°57'61" W), município de Cabo de Santo Agostinho, ambos localizados no litoral sul de Pernambuco (Figura 6). Em Porto de Galinhas foram feitas quatro coletas nos meses de abril, maio, junho e outubro, enquanto que em Suape, apenas uma coleta foi realizada no mês de setembro, todas no ano de 2010.



Figura 6 – Mapa da costa do estado de Pernambuco mostrando os dois locais de coleta.

O muco das colônias normais (colônias saudáveis, sem sintomas de doenças, branqueamento ou necrose de tecido) e branqueadas (colônias que se apresentam ligeiramente pálidas, ou parcial ou totalmente brancas) foi coletado, em tubos de centrífuga estéreis de 50 mL, pela leve raspagem das colônias emersas com as mãos protegidas por luvas. Apenas foi possível coletar muco na condição branqueada no mês de outubro, em Porto de Galinhas, e em Setembro, em Suape. As amostras foram acondicionadas em isopor com gelo e imediatamente transportadas para o laboratório, onde os microrganismos foram isolados e purificados.

2.4.2. Isolamento e preservação das linhagens

O isolamento das bactérias heterotróficas do muco de *P. caribaeorum* foi realizado em meio Ágar Marinho (Difco®, Marine Agar 2216), através das técnicas de plaqueamento “superfície” e “pour plate”. Logo após as coletas, um volume de 3 mL de cada amostra coletada foi inoculado em placas de Petri contendo o meio. Essas placas foram mantidas em

estufa a 30°C em um período de tempo que variou de três a seis dias para o crescimento das colônias. Sob as mesmas condições cada linhagem foi repicada até a placa se apresentar pura com um só morfotipo de bactéria. Todas as bactérias foram analisadas pela técnica de Coloração de Gram.

2.4.3. Extração do DNA e PCR do DNA obtido

O DNA foi extraído por choque térmico. Uma pequena quantidade de cada colônia isolada foi coletada com uma alça de platina, transferida para tubos de 2 mL e dissolvidas em 100 µl de água ultrapura esterilizada. O material foi agitado em vortex e levado a 98 °C por 10 minutos. Em seguida foi dado um choque térmico em freezer -20 °C por 10 minutos. Este material foi centrifugado e o sobrenadante transferido para tubos esterilizados.

Após a quantificação em gel de agarose, 25 ng do DNA de cada amostra foi usado para amplificação dos segmentos 16S rDNA por PCR, usando os primers 27F (5'AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) e 1492R (5'TAC GCY TAC CTT GTT ACG ACT T), para Eubacteria. As reações de 50 µl incluíram, 5 µl de DNA molde, 5 µl (20pmol/µl) de primer *forward*, 5 µl (20pmol/µl) de primer *reverse*, 5 µl de dNTP's, 5 µl de tampão de PCR, 0,1 unidades de Taq DNA polimerase (Fermentas®) e 22 µl de água ultrapura. Os ciclos da reação foram: 94 °C (5 min), 30 ciclos de 94 °C (1 min), 62 °C (1 min) e 72 °C (3 min), seguido de uma etapa de extensão a 72 °C (10 min). O sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose 1% corados com GelRed e os produtos foram purificado por meio do QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN®). Os produtos purificados foram quantificados em espectrofotômetro e diluídos para uma concentração final de 100ng/µl, para as reações de sequenciamento.

2.4.4. Sequenciamento do 16S rDNA

As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit "Reagentes para sequenciamento ABI DYEnamic" (MegaBACE®). As reações foram conduzidas em um volume de 10 µl contendo: 100 ng de (produto de PCR), 2.0 µl do Dyenamic, tampão de PCR 25X (20 mM Tris-HCl pH=8,4), 25 pmoles do oligonucleotídeo *forward* e água (ultrapura q.s.p. 20 µl). Os produtos foram purificados com isopropanol 75%, lavados com etanol 70%, ressuspendidos em 10 µl de formamida e levados para sequenciamento no ABI 3100 – Applied Biosystems®, em sistema capilar.

2.4.5. Análise das sequências obtidas

As sequências foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos no

banco de dados do Gene Bank acessado através do NCBI (National Center for Biotechnology Information) por meio do algoritmo *BLASTn* (Altschul *et al.*, 1990). As identificações foram feitas por comparação com o melhor score oferecido pelo programa e as comparações foram avaliadas por observação do alinhamento feito pelo próprio programa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi analisada a diversidade presente em 50 isolados bacterianos obtidos a partir do muco de *P. caribaeorum* (41 isolados de colônias saudáveis e nove isolados de colônias branqueadas). A comparação das seqüências nucleotídicas do gene 16S rDNA com aquelas depositadas no *GenBank* evidenciou índice de similaridade $\geq 96\%$ com sequencias de bactérias conhecidas em 26% dos isolados obtidos do muco; 70% das seqüências apresentaram entre 90-95% de similaridade e apenas duas amostras ficaram com índice de similaridade abaixo de 90%. De acordo com Reis *et al.* (2009) apenas de 8-14% das seqüências do muco do coral endêmico do Brasil *Mussismilia braziliensis*, coletada em Abrolhos, apresentaram similaridade $\geq 97\%$ com as seqüências depositadas no GenBank. Este baixo número de espécies com índice $\geq 97\%$ encontrado no muco deste coral pode refletir o pequeno número de estudos acerca da microbiota de cnidários e de amostras marinhas de uma forma geral no Brasil.

O número de bactérias obtidas das colônias branqueadas foi bem inferior ao das colônias normais em virtude da sazonalidade do fenômeno do branqueamento no litoral pernambucano. Na maioria das coletas, principalmente na praia de Porto de Galinhas, foi difícil encontrar colônias branqueadas nos meses amostrados. Por isso uma comparação de freqüência de ocorrência e de abundância entre colônias normais e branqueadas ficou prejudicada. Da mesma forma, não é possível comparar freqüência e abundância das bactérias nas duas localidades estudadas porque o número de coletas, e conseqüentemente, de isolados obtidos de Suape (10 isolados) é bem inferior ao de Porto de Galinhas (40 isolados).

O grupo dominante entre as bactérias isoladas foi o γ -Proteobacteria com 36 isolados (72%), seguido de α -Proteobacteria com seis isolados (12%), ambos grupos de bactérias Gram-negativas amplamente distribuídas nos oceanos. Em seguida, aparecem Actinobacteria com seis isolados (12%), e Firmicutes com dois isolados (4%) (Figura 7). De todos os isolados obtidos, apenas 13 (26%) apresentaram índice de similaridade das sequencias nucleotídicas do 16S $\geq 96\%$ no BLASTn, tornando possível a identificação ao nível de espécie. E outros 37 isolados apresentaram índice $\leq 95\%$ e portanto não é possível afirmar com convicção que corresponde à espécie relacionada no *GenBank* (Tabela 1). O filo Proteobacteria foi o mais abundante (84%). Dentro do filo, γ -Proteobacteria foi o grupo mais abundante. Essa dominância também foi observada por Rohwer *et al.* (2002) e Wegley *et al.* (2007) em corais do Caribe e por Koren & Rosenberg (2006) em corais do

Mediterrâneo, mas difere do muco de *M. braziliensis* coletada em Abrolhos em que α -Proteobacteria foi o grupo dominante (Reis *et al.* 2009).

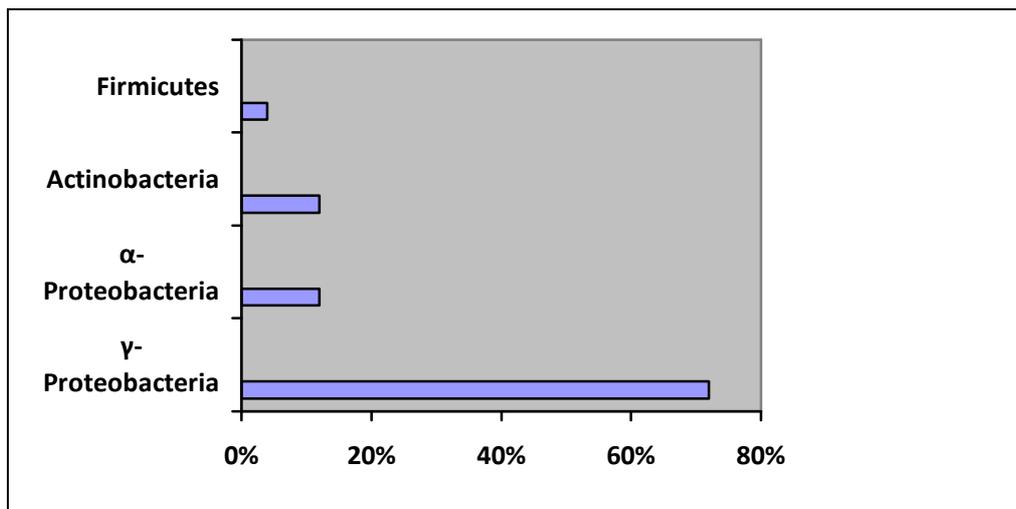


Figura 7 – Gráfico de dominância entre as classes de bactérias encontradas.

Tabela 1 – Lista resumida das espécies de bactérias isoladas do muco de *P. caribaeorum*

Espécies	Máximo % de Identidade
<i>Vibrio</i> sp.	95%
<i>Vibrio harveyi</i>	96%
<i>Vibrio alginolyticus</i>	93%
<i>Vibrio communis</i>	96%
<i>Vibrio proteolyticus</i>	91%
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	96%
<i>Alcanivorax dieselolei</i>	97%
<i>Micrococcus luteus</i>	98%
<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	98%
<i>Nesterenkonia</i> sp.	92%
<i>Brevibacterium</i> sp.	96%
<i>Pseudomonas</i> sp.	95%

<i>Pseudomonas putida</i>	97%
<i>Photobacterium sp.</i>	95%
<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	90%
<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	94%
<i>Pseudoalteromonas piscida</i>	92%
<i>Pseudoalteromonas sp.</i>	94%
<i>Bacillus pumillus</i>	96%
<i>Bacillus sp.</i>	89%
<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	96%
<i>Stappia alba</i>	97%
<i>Stappia marina</i>	97%
<i>Alterierythrobacter sp.</i>	91%
<i>Paracoccus marinus</i>	94%

Castro *et al.* (2010) ao estudarem a diversidade de bactérias associadas a colônias saudáveis e doentes do coral endêmico do Brasil *M. hispida* observaram que Proteobacteria também dominou a microbiota das colônias saudáveis (45-85%), enquanto que 70% da microbiota das colônias doentes consistiram de Bacterioides. Em nosso estudo, 100% das bactérias isoladas nas colônias branqueadas de *P. caribaeorum* pertencem ao grupo γ -Proteobacteria. Em estudos de diversidade da microbiota de corais da Austrália os grupos dominantes também foram γ -Proteobacteria e α -Proteobacteria a depender da espécie (Ceh *et al.* 2011). Wegley *et al.* (2007) também tiveram resultados semelhantes em relação à dominância dos grupos de bactérias encontrados em amostras do coral *Porites astreoides*, sendo Proteobacteria (68%), Firmicutes (10%), Cyanobacteria (7%) e Actinobacteria (6%).

Os resultados da coloração de Gram realizadas em todas as bactérias isoladas para verificar a pureza das linhagens, revelaram que nas colônias saudáveis há um número superior de bactérias Gram-negativas (80%) em relação às Gram-positivas (20%). O mesmo acontece nas colônias branqueadas, onde há uma dominância de linhagens Gram-negativas (90%) contra 10% de bactérias Gram-positivas.

Esses resultados corroboram com a análise do metagenoma dos corais dos recifes do Caribe e do Indo-Pacífico realizado por Cervino *et al.* (2008), em que todos os espécimes doentes apresentavam bactérias Gram negativas, por outro lado, os espécimes saudáveis mostraram um equilíbrio entre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Ainda neste estudo 71% dos isolados foram alocados para o grupo dos vibrios, especialmente para

espécies também encontradas no muco de *P. caribaeorum*, como *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *V. proteolyticus*.

As bactérias Gram-Positivas desempenham um importante papel nos ambientes marinhos e se dividem em dois grandes subgrupos, o filo Actinobacteria e o filo Firmicutes, com representantes neste estudo. Dentre as bactérias do filo Actinobacteria, encontramos neste estudo as espécies *Micrococcus luteus*, *Micrococcus* sp., *Rhodococcus corynebacterioides*, *Nesterenkonia* sp. e *Brevibacterium* sp. Atualmente, pouco é conhecido sobre a diversidade de Actinobacteria em habitats marinhos quando comparados com a diversidade isolada de ambientes terrestres, onde essas bactérias têm sido bastante estudadas devido a sua importância biotecnológica (Menezes *et al.* 2010). Do filo Firmicutes apenas as bactérias *Bacillus pumillus* e *Bacillus* sp. foram registradas. Apesar dos microrganismos marinhos apenas recentemente terem se tornado alvo de estudos para a descoberta de produtos naturais, tem aumentado muito o número de linhagens de bactérias marinhas Gram-positivas com promissoras atividades antibióticas e anticancerígenas (Blunt *et al.* 2006; Kwon *et al.* 2006).

Um número considerável de novas espécies do gênero *Nesterenkonia* foi descrito nos últimos anos. Atualmente o gênero compreende 10 espécies que foram isoladas de ambientes hipersalinos ou alcalinos, assim como solos salinos, organismos marinhos, lagos alcalinos e resíduos de água alcalinos (Luo *et al.* 2009). Um isolado de um representante deste gênero foi obtido a partir do muco de uma colônia saudável de *P. caribaeorum*.

De acordo com Gontang *et al.* (2007) o gênero *Bacillus* é um dos mais abundantes encontrados nos sedimentos marinhos e ao mesmo tempo um dos gêneros mais heterogêneos do domínio bactéria e precisa de uma extensa revisão taxonômica. *Bacillus pumilus*, encontrada no muco de colônias saudáveis de *P. caribaeorum*, também já foi encontrada em áreas lesionadas de corais (Cervino *et al.* 2008). *Bacillus* e *Micrococcus* foram os gêneros mais abundantes isolados de algas, ascídias e esponjas da costa do estado de São Paulo (Menezes *et al.* 2010). As diversas espécies de *Bacillus* presentes no muco de corais exibem atividade antibacteriana contra patógenos, inclusive *B. pumilus* encontrada neste estudo (Shnit-Orland & Kushmaro 2009).

O gênero *Vibrio* foi o melhor representado com 24 dos 50 isolados obtidos, corroborando diversos outros trabalhos em que o *Vibrio core group* é o grupo de bactérias mais comum associado aos corais (Cervino *et al.* 2004; Austin & Zhang 2007; Luna *et al.* 2007). Além dos corais, os vibrios são encontrados também em outros hospedeiros eucariotos como nos moluscos, nas esponjas e no zooplâncton (Thompson *et al.* 2004). Este gênero consiste num grupo diverso de bactérias com 74 espécies distintas sendo

algumas delas, como *V. parahaemolyticus*, indutoras de doenças em seres humanos (Hoffmann *et al.* 2010). A simples presença de espécies de *Vibrio* sugere uma ameaça em potencial no ambiente costeiro (Zhang *et al.* 2006). Os vibrios são abundantes no muco de diferentes espécies de corais e aumenta significativamente sua dominância antes do fenômeno do branqueamento (Bourne *et al.* 2007; Chimetto *et al.* 2008).

Dentro do gênero a espécie *V. harveyi* foi a mais freqüente com 10 isolados (41%). Esta bactéria marinha é Gram-negativa, luminescente e habita diversos nichos desde a superfície da água do mar até o sedimento marinho, além de organismos como peixes, corais e cefalópodos. Nos oceanos é encontrada em estágio de vida livre como parte da flora normal dos animais aquáticos (Ruby & Morin 1979), mas várias linhagens de *V. harveyi* têm sido reconhecidas como patógenos na aquicultura de peixes marinhos (Zhang & Austin 2000) e crustáceos (Bourne *et al.* 2006), além de também causarem infecções em corais ocasionando a necrose do tecido destes animais (Arotsker *et al.* 2009).

A identificação de linhagens de *V. harveyi*, espécie com importância econômica, não é uma tarefa simples dentro do clado Harveyi (*V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. alginolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. parahaemolyticus*, *V. mytili* e *V. natriegens*) porque na família Vibrionaceae, a similaridade entre as seqüências para o gene 16S rRNA é de $\geq 97,6\%$ (Dorsch *et al.* 1992; Sawabe *et al.* 2007). Para identificar as espécies de vibrios é importante sequenciar os segmentos dos genes *recA*, *pyrH* e *toxR* (Chimetto *et al.* 2009; Pang *et al.* 2006). As semelhanças fenotípicas e genotípicas entre os membros do grupo são tão altas que quase nenhuma característica fenotípica é suficiente para determinar as espécies.

Dois isolados similares a *V. alginolyticus* foram obtidos do muco de *P. caribaeorum*. Esta bactéria é comum na água do mar e tem sido isolada de diferentes organismos como parte da microbiota saprofítica (Carli *et al.* 1993). Já foi sugerido que esta espécie é um patógeno de diversos animais marinhos e de seres humanos (Blake *et al.* 1980; Rikelme *et al.* 1996). *V. communis* foi recentemente descrita por Chimetto *et al.* (2011a) a partir de colônias de alguns cnidários, inclusive de *P. caribaeorum*, assim como neste estudo.

Apesar de bactérias do gênero *Vibrio* serem umas das responsáveis pela promoção de doenças em corais, como a *black band disease* (Arotsker *et al.* 2009), várias dessas espécies foram encontradas também em colônias saudáveis de *P. caribaeorum*. Bactérias como *V. communis*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus*, espécies conhecidas por serem patógenos de corais (Bourne *et al.* 2009), foram encontradas tanto em colônias saudáveis como branqueadas. A presença de vibrios em colônias saudáveis é intrigante, mas várias espécies podem estabelecer relações mutualísticas provendo nutrientes e metabólitos secundários para seus hospedeiros (Ritchie 2006), até que algum estresse ambiental ative

seus fatores de virulência causando danos aos hospedeiros. Ao contrário dos resultados apontados neste estudo, Arotsker *et al.* (2009) não conseguiram isolar vibrios de áreas aparentemente saudáveis da colônia de corais do gênero *Favia*. Os autores explicam que isso ocorreu provavelmente pela baixa concentração dessas bactérias no muco e no tecido dos corais.

Alguns vibrios podem estabelecer relações mutualísticas importantes com os corais por serem, por exemplo, capazes de fixar o nitrogênio (Ritchie 2006). De acordo com Chimetto *et al.* (2008) que analisaram as bactérias cultiváveis capazes de realizar a fixação do nitrogênio, a dominância de espécies de vibrios como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus* e *V. alginolyticus* no muco deste cnidário pode ser explicada por estas bactérias fixarem o nitrogênio. No complexo holobionte, esses vibrios podem obter o nitrogênio através da desnitrificação mediada pelos microrganismos no muco de *P. caribaeorum* (Chimetto *et al.* 2008).

Ao mesmo tempo, estas bactérias sob condições de estresses ambientais como alta temperatura da água do mar e altas concentrações de matéria orgânica podem se tornar patógenos oportunistas ao competir com outras espécies presentes no muco do coral (Dinsdale *et al.* 2008). Um dos fatores responsáveis pela patogenicidade das bactérias do gênero *Vibrio* é a ativação de suas proteases extracelulares que agem degradando o tecido dos animais (Arotsker *et al.* 2009; Sussman *et al.* 2008). Esta atividade enzimática é acelerada quando há elevação da temperatura da água do mar provavelmente pelo aumento da atividade das bactérias. Este fenômeno pode explicar o aumento da progressão de doenças, como a *black band disease* e o branqueamento, em períodos de altas temperaturas (Arotsker *et al.* 2009). Isto sugere que possivelmente os fatores de virulência das espécies *V. parahemolyticus*, *V. harveyi* e *V. alginolyticus* isoladas de colônias saudáveis de *P. caribaeorum*, não foram ativados por estresses ambientais.

As bactérias *Stappia marina* e *Stappia alba* foram encontradas no muco de *P. caribaeorum* e assim como todas as outras linhagens conhecidas do gênero *Stappia*, possuem o gene para a monóxido de carbono desidrogenase e são capazes de oxidar o monóxido de carbono (King 2003). *S. marina* foi isolada e descrita por Kim *et al.* (2006) do Mar Amarelo, na Coreia e *S. alba* isolada e descrita pela primeira vez de ostras do Mar Mediterrâneo e assim como *Alcanivorax dieselolei* também é capaz de degradar compostos aromáticos junto com outros membros do clado Roseobacter (Pujalte *et al.* 2005). *A. dieselolei* é uma bactéria Gram-negativa que é capaz de usar os hidrocarbonetos de petróleo como fonte de carbono e energia, e tem sido usada na biorremediação de sistemas costeiros poluídos.

Este foi o primeiro registro de associação entre a bactéria *A. dieselolei* e o zoantídeo *P. caribaeorum*. Grande parte das linhagens de *Alcanivorax* isoladas até o momento tinha sido coletada de amostras de água do mar e do sedimento marinho, de onde originalmente esta espécie foi isolada e descrita, mas nunca de um zoantídeo ou de um coral (Liu; Shao, 2005; Cappello et al, 2007; Rivas et al, 2007; Wu et al, 2009).

Algumas linhagens não identificadas de *Alcanivorax* já foram isoladas de outros invertebrados, como esponjas e gorgônias (Sfanos et al, 2005). O fato de *A. dieselolei* ter sido isolado de colônias *P. caribaeorum* no presente estudo, é intrigante por esta bactéria ser conhecida por ter como principal fonte de recursos nutricionais e energéticos os derivados do petróleo. E até onde se sabe, a praia de Porto de Galinhas, não é afetada diretamente por este tipo de poluente.

Em processos de biorremediação para aumentar as populações naturais de bactérias que degradam hidrocarbonetos, uma das técnicas usadas é a introdução de nutrientes, como fósforo e nitrogênio. A presença desses compostos juntos interrompe o estado de quiescência de espécies de *Alcanivorax* fazendo com que elas se tornem o grupo dominante (Cappello et al, 2007). Essas bactérias contribuem para a degradação de compostos de nitrogênio e fósforo que são acumulados em áreas costeiras.

Sabe-se que *P. caribaeorum* possui na sua microbiota normal espécies de vibrios capazes de realizar a fixação do Nitrogênio (Chimetto et al, 2008). Uma das possíveis explicações para a presença *A. dieselolei* em *P. caribaeorum* pode ser a alta concentração de compostos como fósforo e nitrogênio em seu muco. *A. dieselolei* provavelmente utiliza esses compostos como fonte de recursos.

O gênero *Altererythrobacter* foi proposto por Kwon et al (2007) e compreende bactérias Gram-negativas mesofílicas com apenas quatro espécies válidas publicadas, *A. epoxidivorans* (Kwon et al. 2007), *A. luteolus* (Yoon et al. 2005; Kwon et al. 2007), *A. indicus* (Kumar et al. 2008) e *A. marensis* (Seo & Lee 2010). Uma colônia de *Altererythrobacter* foi obtido do muco de *P. caribaeorum* com um índice de similaridade de 91%. Por se tratar de um gênero recentemente descrito e ainda com poucas espécies descritas, a bactéria encontrada neste estudo pode representar uma nova espécie.

O gênero *Pseudovibrio* foi proposto por Shieh et al. (2004) e possui apenas três espécies descritas. São bactérias Gram-negativas, halofílicas, anaeróbicas facultativas que se movem através de um dos diversos flagelos laterais ou subpolar e que apresentam potencial para produzir compostos bioativos (Sertan-de-Guzman et al. 2007). Até então estas bactérias eram classificadas dentro de outros gêneros como *Vibrio*, *Photobacterium*, *Enterovibrio* e *Grimontia*. Porém, nunca tinha sido reconhecida uma espécie deste grupo

com capacidade desnitrificante (Shieh *et al.* 2004). A bactéria *P. denitrificans*, encontrada no muco de *P. caribaeorum*, foi a primeira a ser descrita, e foi isolada da água do mar em Taiwan (Shieh *et al.* 2004). Ela tem este nome por ser capaz de realizar a desnitrificação que é a redução do nitrato (NO_3) ou nitrito (NO_2) em produtos gasosos como o óxido nitroso (N_2O) ou o gás nitrogênio (N_2) com o objetivo de produzir energia (Shieh *et al.* 2004). Diferentemente deste estudo onde só foi obtido um isolado desta bactéria, Muscholl-Silberhorn *et al.* (2008) verificaram que *P. denitrificans* foi dominante em culturas de bactérias isoladas de esponjas do Mar Mediterrâneo.

O gênero *Paracoccus* é formado por bactérias Gram-negativas, esféricas, catalase e oxidase positivas, redutoras de nitrato, aeróbicas e não-móveis e compreende cerca de 30 espécies válidas (Dastager *et al.* 2011). A bactéria *P. marinus* foi a espécie melhor relacionada no GenBank com a seqüência isolada do muco de *P. caribaeourm* com 94% de similaridade.

Pseudoalteromonas é um gênero de bactérias marinhas, heterotróficas e aeróbicas que compreende um dos grupos taxonômicos mais abundantes de Proteobacteria e é amplamente distribuído no ambiente marinho (Gauthier *et al.* 1995). Neste estudo foram encontradas quatro isolados relacionados a espécies diferentes, *P. ruthenica*, *P. rubra*, *P. piscida* e *Pseudoalteromonas* sp. A bactéria *P. ruthenica* foi isolada e descrita pela primeira vez de moluscos coletados na costa do Japão (Ivanova *et al.* 2002). A espécie *P. piscida*, presente no muco de *P. caribaeorum*, é um dos principais mediadores da degradação da quitina, exercendo um papel crucial na reciclagem deste composto (Miyamoto *et al.* 2007). Este polissacarídeo é o segundo composto orgânico mais abundante na natureza e é encontrado no endoesqueleto e no exoesqueleto de muitos organismos marinhos, como moluscos, cnidários, protozoários e crustáceos.

A interação entre as bactérias dentro do complexo holobionte ou de biofilmes onde há um agregado de microrganismos interagindo constantemente exerce um papel importante na ecologia marinha (Strom, 2008). Algumas bactérias coletadas de amostras de água do mar e de organismos marinhos possuem atividades antibacterianas com potenciais biotecnológicos (Gram *et al.* 2010). Bactérias do gênero *Pseudoalteromonas*, como as espécies *P. ruthenica*, *P. rubra* e *P. piscida* encontradas neste estudo no muco de *P. caribaeorum*, já foram relatadas como produtoras de compostos com propriedades antibacterianas. Além destas bactérias, espécies dos gêneros *Vibrio*, *Photobacterium*, *Pseudomonas* e *Micrococcus*, também encontrados neste estudo, são descritos como capazes de produzir estes compostos (Gram *et al.* 2010). Algumas espécies de *Photobacterium* associadas aos corais já mostraram serem capazes de produzir antibióticos

para proteger o coral holobionte (Ritchie, 2006). A espécie *Photobacterium jeanii*, descrita pela primeira vez no Brasil, foi isolada de colônias de três espécies de cnidários, entre eles *P. caribaeorum*. No presente trabalho, um isolado apresentou 95% de similaridade nucleotídica com uma sequência obtida dessa espécie, levando-nos a crer que nosso isolado possa pertencer a essa espécie.

Os mecanismos que estas bactérias utilizam para inibir outras bactérias não são bem conhecidos, porém diversas espécies de *Pseudoalteromonas* produzem metabólitos secundários extracelulares, enquanto que outras podem interagir através da competição por nutrientes (Fredrickson; Stephanopoulos, 1981; Bowman, 2007). Enquanto os vibrios chamam mais a atenção dos pesquisadores como bactérias causadoras de doenças em organismos aquáticos ou em seres humanos, os representantes do gênero *Pseudoalteromonas* são conhecidos por produzir compostos antibacterianos (Bowman, 2007; Gram *et al.* 2010). Das quatro linhagens do gênero *Pseudoalteromonas* encontradas neste estudo, três (*P. rubra*, *P. piscida* e *Pseudoalteromonas* sp.) foram isoladas de colônias branqueadas. Isso pode indicar uma possível participação dessas linhagens no fenômeno do branqueamento. Poucos estudos têm demonstrado que esse efeito antagonista também é encontrado na família Vibrionaceae, incluindo espécies conhecidas por serem patógenos e que foram encontradas no muco de *P. caribaeorum* como *V. parahaemolyticus* (Radjasa *et al.* 2007) e *V. alginolyticus* (Austin *et al.* 1995).

Muitas espécies de bactérias são conhecidas por produzirem toxinas como metabólitos secundários. A Tetrodotoxina (TTX) é uma neurotoxina presente em muitos organismos marinhos, em especial nos gastrópodes, responsável por muitos casos de intoxicação. Acredita-se que ela seja de origem bacteriana e muitas bactérias produtoras de TTX já foram isoladas de animais marinhos. Esta toxina apresenta similaridades ecológicas com a palitoxina que também é bem comum em diversos organismos marinhos e é produzida por diversos clados de bactérias (Wang *et al.* 2008).

Bactérias pertencentes aos três maiores filos foram isoladas de *P. caribaeorum* por Seemann *et al.* (2009) e apresentaram atividade semelhante a da palitoxina através de testes de sensibilidade. Entre as bactérias produtoras da TTX e da palitoxina, algumas também foram isoladas neste estudo, como *Pseudomonas* sp, *Pseudoalteromonas* sp, *Brevibacterium* sp, *Bacillus* sp, *Micrococcus luteus*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus*, *V. harveyi* e *V. proteolyticus*. Estes resultados sugerem a origem bacteriana da palitoxina e a ampla ocorrência deste composto em diversos organismos marinhos como corais, esponjas, poliquetos, moluscos, crustáceos e peixes (Mebs 1998), uma vez que essas bactérias são comuns em muitos invertebrados marinhos.

As espécies obtidas do muco de *P. caribaeorum* obtidas neste estudo não foram bem relacionadas com seqüências da microbiota de corais apresentadas em outros estudos, o que suporta a hipótese de que as bactérias estabelecem associações espécie-específica com os cnidários (Rohwer *et al.* 2002).

As sequências que apresentaram baixa similaridade em relação a espécies depositadas no GenBank podem representar novas taxa. Reis *et al.* (2009) sugerem que o muco dos cnidários pode prover uma ampla variedade de micronichos para a diversificação de bactérias. Uma evidência disso é que diversas espécies fixadoras de nitrogênio de Proteobacteria encontradas no muco de *Mussismilia braziliensis* podem ter co-evoluído de bactérias diazotróficas em corais de todo o mundo.

Recentemente, um número considerável de linhagens bacterianas tem sido isolado dos oceanos como parte de estudos que objetivam o entendimento da diversidade de microrganismos e suas funções nos ecossistemas marinhos de todo o mundo. Muitos desses estudos filogenéticos têm identificado novos microrganismos, em especial nos oceanos Índico e Pacífico, onde os pesquisadores asiáticos têm se dedicado a descrição de novas espécies (Lai *et al.* 2009; Luo *et al.* 2009). Antes de caracterizar taxonomicamente uma linhagem, os pesquisadores tentam selecionar bactérias com potenciais biotecnológicos, como é o caso de bactérias descritas do Oceano Índico capazes de degradar óleo (Lai *et al.* 2009).

É evidente a necessidade de mais estudos de taxonomia de microrganismos associada aos cnidários distribuídos na costa do Brasil. Recentemente, pesquisadores brasileiros que realizaram estudos de diversidade utilizando técnicas de cultivo e também através de metagenoma identificaram sete espécies novas em apenas algumas poucas espécies de corais, zoantídeos e gorgônias da costa brasileira. São elas, *Photobacterium jeanii* (Chimetto *et al.* 2010), *P. swingsii* (Gomez-Gil *et al.* 2011), *Marinomas brasiliensis* (Chimetto *et al.* 2010a), *Vibrio variabilis*, *V. marinum* (Chimetto *et al.* 2011c), *V. communis* (Chimetto *et al.* 2011a) e *Marinobacterium coralli* (Chimetto *et al.* 2011b).

Essas novas espécies revelam que o estudo da diversidade de bactérias associada aos cnidários no Brasil ainda está no início. Várias outras espécies de cnidários e de outros invertebrados marinhos e também, outras regiões do país, ainda continuam sem serem estudadas deste ponto de vista. Estudos de diversidade microbiana associada a invertebrados marinhos têm se restringido apenas a poucas localidades no Brasil, como em São Sebastião-SP, Armação dos Búzios-RJ e Abrolhos-BA, portanto este é o primeiro estudo fora desse eixo que fica entre o sul do estado da Bahia e o estado de São Paulo.

Este estudo foi o primeiro levantamento desenvolvido no Brasil acerca da diversidade da microbiota associada ao muco de *P. caribaeorum* pertencentes a todos os grupos de bactérias. As únicas espécies que já haviam sido inventariadas a partir do muco de *P. caribaeorum* foram *Photobacterium jeanii*, *Vibrio alginolyticus*, *V. campbellii*, *V. harveyi*, *V. mediterranei*, *V. rotiferianus*, *V. tubiashii*, *V. marinum* e *V. communis*, *V. variabilis*, *V. parahaemolyticus* e *Alteromonas* sp (Chimetto *et al.* 2008; Chimetto *et al.* 2009). É notório que a maior parte dos estudos de microbiota associada aos cnidários do Brasil são voltados para o gênero *Vibrio*. Ressalta-se a necessidade de novos estudos de diversidade mais abrangentes de forma a permitir conhecer com mais profundidade toda a diversidade presente nos mares brasileiros e seus respectivos recursos biotecnológicos.

Segundo Koren & Rosenberg (2008), claramente a microbiota que habita o muco difere da presente no tecido tanto numericamente como qualitativamente. Os autores comprovam em seu estudo que no tecido há uma diversidade maior, possivelmente por o tecido apresentar um número maior de nichos, como o trato digestório e a mesoglêia. Apesar disso, os microbiologistas de corais têm focado mais as bactérias que habitam o muco (Ducklow & Mitchell 1979; Rohwer *et al.* 2001). Dessa forma é fundamental que estudos futuros com *P. caribaeorum* foquem também a diversidade de bactérias associada ao tecido para que possamos ter uma melhor compreensão da comunidade microbiana que habita este zoantídeo e comparar as duas comunidades.

A melhor forma de prevenir e de minimizar o impacto sobre os recifes brasileiros em decorrência de processos traumáticos para os corais e zoantídeos, como doenças e o branqueamento, seria intensificar o manejo de forma a ter um controle continuado da dinâmica dos recifes. Projetos de manejo continuado dos ecossistemas recifais de forma a permitir o acompanhamento a médio-longo prazo trariam subsídios para os pesquisadores de ecologia microbiana avaliarem o grau de risco a que estão submetidos os ecossistemas recifais brasileiros e suas espécies. Evitando assim, riscos de extinção de algumas espécies recifais, como é o caso da espécie de coral ameaçado de extinção endêmico do Brasil *M. braziliensis*, e prevendo possíveis proliferações em massa de doenças infecciosas ao serem identificadas mudanças drásticas na diversidade da comunidade normalmente associada a um zoantídeo, por exemplo. A previsão desses sinais pode servir como um importante bioindicador de estresses ambientais.

É necessário que se intensifiquem estudos de diversidade microbiana em *P. caribaeorum* para entender melhor o papel destas bactérias nas propriedades farmacológicas do muco relatada por populares e comprovadas por Soares *et al.* (2006) e também conhecer por completo toda a diversidade presente no muco. Para isso estudos

metagenômicos são essenciais, bem como o isolamento dos microrganismos e a cultura dos clusters dominantes.

2.6. REFERÊNCIAS

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403–410.

Arotsker, L., Siboni, N., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Loya, Y. and Kushmaro, A. (2009) *Vibrio* sp. as a potentially important member of the Black Band Disease (BBD) consortium in *Favia* sp. Corals. *FEMS Microb Eco* **70**, 515-524.

Austin, B., Stuckey, L.F., Robertson, P., Effendi, J. and Griffith, D. (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalli*. *J Fish Dis* **18**, 93-96.

Austin, B. and Zhang, X.H. (2007) *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* **43**, 119–124.

Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J. and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shioli*. *Curr Microbiol* **46**, 418-422.

Blake, P., Weaver, R.E. and Hollis, D.G. (1980) Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Annu Rev Microbiol* **34**, 341–367.

Blunt, J.W., Copp, B.R., Munro, M.H.G., Northeote, F.T. and Prinsep, M.R. (2006) Marine natural products. *Nat Prod Rep* **2326**, 78.

Bourne, D.G., Garren, M., Work, T.M., Rosenberg, E., Smith, G.W. and Harvell, D.C. (2009) Infectious disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol*, **17**, 554-562.

Bourne, D.G., Høj, L., Webster, N.S., Swan, J. and Hall, M.R. (2006) Biofilm development within a larval rearing tank of the tropical rock lobster, *Panulirus ornatus*. *Aquaculture* **260**, 27–38.

Bourne, D.G., Iida Y., Uthicke, S. and Smith-Keune, C. (2007) Changes in coral-associated microbial communities during a bleaching event. *ISME J*, **2**, 350–363.

- Bourne, D.G. and Munn, C.B. (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Envir Microbiol* **7** (8), 1162-1174.
- Bowman, J.P. Bioactive compound synthetic capacity and ecological significance of marine bacterial genus *Pseudoalteromonas*. (2007) *Mar Drugs*, **5**, 220-241.
- Cappello, S., Denaro, R., Genovese, M., Giuliano, L. and Yakimov, M. M. (2007) Predominant growth of *Alcanivorax* during experiments on “oil spill bioremediation” in mesocosms. *Microbiological Research* **162**, 185-190.
- Carli, A., Pane, L., Casareto, L., Bertone, S. and Pruzzo, C. 1993. Occurrence of *Vibrio alginolyticus* in Ligurian coast rock pools (Tyrrhenian Sea, Italy) and its association with the copepod *Tigriopus fulvus* (Fisher 1860). *Appl Environ Microbiol* **59**, 1960–1962.
- Castro, A.P., Araújo Jr., S.D., Reis, A.M.M., Moura, R.L. et al. (2010) Bacterial community associated with healthy and disease reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microb Ecol* **50**, 658-667.
- Ceh, J., Van Keulen, M. and Bourne, D.G. (2011) Coral-associated bacterial communities on Ningaloo Reef, Western Australia. *FEMS Micob Ecol*, **75**, 134-144.
- Cervino, J.M., Hayes, R., Polson, S., Polson, S.C., Goreau, T.J., Martinez, R.J. and SMITH, G.W. (2004) Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/ band disease in Caribbean corals. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6855–6864.
- Cervino, J.M., Thompson, F.L., Gomez-Gil, B., Lorence, E.A., Goreau, T.J. et al. (2008) The *Vibrio* core group induces yellow band disease in Caribbean and Indo-Pacific reef-building corals. *J Appl Microbiol* **105** (5), 1658-1671.
- Chimetto, L.A., Brocchi, M., Gondo, M., Thompson, C.C., Gomez-Gil, B. and Thompson, F.L. (2009) Genomic diversity of vibrios associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). *J Appl Microbiol* **106**, 1818-1826.

Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Alves Jr., N., Silva, B.S., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P. and Thompson, F. L. (2011a) *Vibrio communis* sp. nov., isolated from marine animals (*Mussismilia hispida*, *Phyllogorgia dilatata*, *Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Litopenaeus vannamei*). *Int J Syst Evol Microbiol*, **61**, 362-368.

Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Thompson, C. C., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P. and Thompson, F. L. (2010) *Photobacterium jeanii* sp. nov., isolated from corals and zoanthids. *Int J Syst Evol Microbiol*, **60**, 2843-2848.

Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P. and Thompson, F. L. (2010a) *Marinomonas brasiliensis* sp. nov. isolated from the coral *Mussismilia hispida* and reclassification of *Marinomonas basaltis* as a later synonym of *Marinomonas communis*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 1170.

Chimetto, L.A., Cleenwerck, I., Brocchi, M., Willems, A. De Vos, P. and Thompson, F. L. (2011b) *Marinobacterium coralli* sp. nov., isolated from coral mucus (*Mussismilia hispida*). *Int J Syst Evol Microbiol* **61**, 60-64.

Chimetto, L. A., Cleenwerck, I., Moreira, A.P.B., Brocchi, M., Willems, A., De Vos, P. and Thompson, F.L. (2011c) *Vibrio variabilis* sp. nov. and *Vibrio marinum* sp. nov., isolated from *Palythoa caribaeorum*. *Int J Syst Evol Microbiol*.

Chimetto, L.A., Brocchi, M., Thompson, C.C., Martins, R.C.R., Ramos, H.B. and Thompson, F.L. (2008) Vibrios dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 312-319.

Cortés, J. and Jiménez, C.E. (2003) Past, present and future of the coral reefs of the Caribbean coast of Costa Rica. In Latin American Coral Reefs ed. Cortés, J. pp.223-239. Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Dastager, S.G., Deepa, C.K., Li, W-J., Tang, S-K and Pandey, A. (2011) *Paracoccus niistensis* sp nov., isolated from forest soil, India. *Anton Leeuw Int J G*, **99** (3), 501-506.

Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J.M., Furlan, M., Desnues, C. et al. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature*, **452**, 629-632.

Dorsch, M., Lane, D. and Stackebrandt, E. (1992) Towards a phylogeny of the genus *Vibrio* based on 16S rRNA sequences. *Int J Syst Evol Microbiol* **42**, 58–63.

Ducklow, H.W. and Mitchell, R. (1979) Composition of mucus released by coral reef coelenterates. *Limnol Oceanogr* **24**, 706-714.

Fredrickson, A.G. and Stephanopoulos, G. (1981) Microbial competition. *Science* **213**, 972-979.

Gauthier, G., Gauthier, M. and Christen, R. (1995). Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteromonas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int J Syst Bacteriol* **45**, 755-761.

Gomez-Gil, B., Roque, A., Rotllant, G., Peinado, L., Romalde, J.L., Doce, A., Cabanillas-Beltrán, H., Chimetto, L.A. and Thompson, F.L. (2011) *Photobacterium swingsii* sp. nov. isolated from marine organisms. *Int J Syst Evol Microbiol*, **61**, 315-319.

Gontang, E.A., Fenical, W. and Jensen, P.R. (2007) Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Envir Microb* **73** (10), 3272-3282.

Gram, L., Melchiorson, J. and Bruhn, J.B. (2010) Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a Global Sampling of Ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Mar Biotechnol* **12**, 439-451.

Herndl, G.L. and Velimirov, B. (1986) Microheterotrophic utilization of muçus released by the Mediterranean coral *Cladocora cespitosa*. *Mar Biol* **90**, 363-369.

Hoffmann, M., Fischer, M., Ottesen, A., McCarthy, P.J., Lopez, J.V., Brown, E.W. and Monday, S.R. (2010) Population dynamics of *Vibrio* spp. associated with marine sponge microcosms. *ISME J* **4**, 1608–1612.

Hubbard, J.A.E.B. and Pocock, Y.K. (1972) Sediment rejection by recent scleractinian corals: a key to palaeo-environmental reconstruction. *Geol Rdsch*, **61**, 598-626.

Ivanova, E.P., Sawabe, T., Lysenko, A.M. et al. (2002) *Pseudoalteromonas ruthenica* sp. nov, isolated from marine invertebrates. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 235-240.

Kellogg, C.A. (2004) Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar Ecol Prog Ser* **273**, 81-88.

Kim, B.-C., Park, J.R., Bae, J.-W., Rhee, S.-K., Kim, K.-H., Oh, J.-W. and Park, Y.-H. (2006) *Stappia marina* sp. nov., a marine bacterium isolated from the Yellow Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 75-79.

King, G.M. (2003) Molecular and culture-based analyses of aerobic carbon monoxide oxidizer diversity. *Appl Environ Microbiol* **69**, 7257–7265.

Koren, O. and Rosenberg, E. (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* **72** (8), 5254-5259.

Koren, O. and Rosenberg, E. (2008) Bacteria associated with the bleached and cave coral *Oculina patagonica*. *Microb Ecol* **55**, 523-529.

Kumar, N.R., Nair, S., Langer, S., Busse, H.-J. and Kampfer, P. (2008) *Altererythrobacter indicus* sp. nov., isolated from wild rice (*Porteresia coarctata* Tateoka). *Int J Syst Evol Microbiol*, **58**, 839–844.

Kvennefors, E.C.E., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O., Degnan, B.M. and Barnes, A.C. (2008) An ancient and variable mannose-binding lectin from the coral *Acropora millepora* binds both pathogens and symbionts. *Dev Comp Immunol* **32**, 1582-1592.

Kwon, H.C., Kauffman, C.A., Jensen, F.R. and Fenical, W. (2006) Marinomycins A-D, antitumor-antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Mafutispora*. *J Am Chem Soc* **128**, 1622-1662.

Kwon, K. K., Woo, J. H., Yang, S.-H., Kang, J. H., Kang, S. G., Kim, S. J., Sato, T. and Kato, C. (2007) *Altererythrobacter epoxidivorans* gen. nov., sp. nov., an epoxide hydrolase-active, mesophilic marine bacterium isolated from cold-seep sediment, and reclassification of *Erythrobacter luteolus* Yoon et al. 2005 as *Altererythrobacter luteolus* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2207–2211.

Lai, Q., Yuan, J., Gu, L. and Shao, Z. (2009) *Marispirillum indicum* gen. nov., sp. nov., isolated from a deep-sea environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 1278–1281.

Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P. and Testa, V. (2003) Corals and Coral Reefs of Brazil. In Latin America Coral Reefs ed. Cortês J. pp.9-52. Amsterdam: Elsevier Publisher.

Lewis, J.B. and Price, W.S. (1976) Patterns of ciliary currents in Atlantic reef corals and their functional significance. *J Zool Lond* **178**, 77-89.

Liu, C. and Shao, Z. (2005) *Alcanivorax dieselolei* sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium isolated from sea water and deep-sea sediment. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1181-1186.

Luna, G.M., Biavasco, F. and Danovaro, R. (2007) Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. *Environ Microbiol* **9**, 1851–1857.

Luo, H.-Y., Wang, Y.-R., Miao, L.-H., Yang, P.-L., Shi, P.-J., Fang, C.-X., Yao, B. and Fan, Y.-L. (2009) *Nesterenkonia alba* sp. nov., an alkaliphilic actinobacterium isolated from the black liquor treatment system of a cotton pulp mill. *Int J Syst Evol Microbiol* **59**, 863-868.

Mebs, D. Occurrence and sequestration of toxins in food chains. (1998) *Toxicon* **36**, 1519-1522.

Menezes, C.B.A. et al. Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the North coast of São Paulo state, Brazil. (2010) *Microbiological Research* **165**, 466-482.

- Miyamoto, K., Okunishi, M., Nukui, E., Tsuchiya, T., Kobayashi, T., Imada, C. and Tsujibo, H. (2007) The regulator CdsS/CdsR two-component system modulates expression of genes involved in chitin degradation of *Pseudoalteromonas piscicida* strain O-7. *Arch Microbiol* **188**, 619-628.
- Moore, R.E. and Bartolini, G. (1981) Structure of palytoxin. *J Am Chem Soc* **103**, 2491–2494.
- Muscholl-Silberhorn, A., Thiel, V. and Imhoff, J. F. (2008) Abundance and bioactivity of cultured sponge-associated bacteria from the Mediterranean Sea. *Microbial Ecology* **55** (1), 94-106.
- Pandolfi, J.M., Bradbury, R.H., Sala, E. et al. (2003) Global trajectories of the long-term decline of coral reef ecosystems. *Science* **301**, 955-958.
- Pang, L., Zhang, X.-H., Zhong, Y., Chen, J., Li, Y., and Austin, B. (2006) Identification of *Vibrio harveyi* using PCR amplification of the *toxR* gene. *Lett Appl Microbiol*, **43**, 249–255.
- Pérez, C.D., Vila-Nova, D.A. and Santos, A.M. (2005) Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Anthozoa) from littoral of Pernambuco, Brazil. *Hydrobiologia* **548**, 207-215.
- Pujalte, M.J., Macián, M.C., Arahal, D.R. and Garay, E. (2005) *Stappia alba* sp. nov., isolated from Mediterranean oysters. *Systematic and Applied Microbiology* **28**, 672-678.
- Radjasa, O.K., Sabdono, A., Zoehi, J. and Zoehi, E. (2007) Richness of secondary metabolite-producing marine bacteria associated with the sponge *Haliclona* sp. *Int J Pharmacol* **3**, 275-279.
- Reis, A.M.M., Araújo Jr, S.D., Moura, R.L., Francini-Filho, R.B., Pappas Jr, G., Coelho, A.M.A., Krüger, R.H. and Thompson, F.L. (2009) Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *Journal of Applied Microbiology* **106**, 1378-1387.

- Richardson, L.L. and Aronson, R. Infectious diseases of coral reefs. (2002) *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium* **1**, Bali, Indonesia, 1225-1230.
- Rikelme, C., Toranzo, A.E., Barja, J.L., Vergara, N. and Araya, R. (1996) Association of *Aeromonas hydrophila* and *Vibrio alginolyticus* with larval mortalities of scallop (*Argopecten purpuratus*). *J Invert Pathol* **67**, 213–218.
- Ritchie, K.B. Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. (2006) *Mar Ecol Progr Ser* **322**, 1-14.
- Rivas, R., García-Fraile, P., Peix, A., Mateos, P. F., Martínez-Molina, E. and Velázquez, E. (2007) *Alcanivorax balearicus* sp. nov., isolated from Lake Martel. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**: 1331-1335.
- Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, F. and Knowlton, N. (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastrea franksi*. *Coral Reefs* **20**, 85-91.
- Rohwer, F., Seguritan, V. and Knowlton, N. (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **243**, 1-10.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I. (2007) The role of microorganism in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* **5**, 355-362.
- Ruby, E.G. and Morin, J.G. Luminous enteric bacteria of the marine fishes: a study of their distribution, densities, and dispersion. (1979) *Appl Environ Microbiol* **38**, 406–411.
- Ryland, J.S. and Lancaster, J.E. (2003). Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia: Zoanthidea) in the tropical West Pacific. *Invertebrate Systematics* **17**, 407-428.
- Sawabe, T., Kita-Tsukamoto, K. and Thompson, F.L. (2007) Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* **189**, 7932–7936.

Seemann, P., Gernert, C., Schmitt, S., Mebs, D. and Hentschel, U. (2009) Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. *Anton Leeuw Int J G*

Seo, S.H. and Lee, S.D. (2010) *Altererythrobacter marensis* sp. nov., isolated from seawater. *Int J Syst Evol Microbiol* **60**, 307-311.

Sertan-De-Guzman, A.A. et al. (2007) *Pseudovibrio denitrificans* strain Z143-1, a heptylprodigiosin-producing bacterium isolated from a Philippine tunicate. *FEMS Microbiol Lett* **277**(2), 188-196.

Sfanos, K., Harmody, D.K., Mccarthy, P.J., Dang, P., Pomponi, S.A. and Lopez, J.V. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep water marine invertebrates. *Syst Appl Microbiol* **28**, 242-264.

Shieh, W.Y., Lin, Y.-T. and Jean, W.D. (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2307-2312.

Shieh, W.Y., Lin, Y.-T. and Jean, W.D. (2004) *Pseudovibrio denitrificans* gen. nov., sp. nov., a marine, facultatively anaerobic, fermentative bacterium capable of denitrification. *Int J Syst Evol Microbiol* **54**, 2307–2312.

Shnit-Orland, M. and Kushmaro, A. (2009) Coral mucus associated bacteria: a possible first line of defense. *FEMS Microbiol Ecol* **67**, 371-380.

Soares, C.L.S., Pérez, C.D., Maia, M.B.S., Silva, R.S. and Melo, L.F.A. (2006) Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Rev Bras Farmacogn* **16** (4), 463-468.

Sorokin, Y.I. (1973) Trophical role of bacteria in the ecosystem of the coral reef. *Nature* **242**, 415-417.

Strom, S.L. (2008) Microbial ecology of ocean biogeochemistry: a community perspective. *Science* **320**, 1043-1045.

- Sussman, M., Willis, B.L., Victor, S. and Bourne, D.G. (2008) Coral pathogens identified for White Syndrome (WS) epizootics in the Indo-Pacific. *Plos ONE* **3**, e2393.
- Thompson, F.L., Iida T. and Swings, J. (2004) Biodiversity of Vibrios. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **68** (3), 403–431.
- Wang, X-J., Yu, R-C., Luo, X., Zhou, M-J. and Lin, X-T. (2008) Toxin-screening and identification of bacteria isolated from highly toxic marine gastropod *Nassarius semiplicatus*. *Toxicon* **52**, 55-61.
- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H. and Rohwer, F. (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* **9**, 2707-2719.
- Wild, C., Huettel, M., Klüeter, A., Kremb, S.G., Rasheed, M. and Jørgensen, B.B. (2004) Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. *Nature* **428**, 66-70.
- Wu, Y., Lai, Q., Zhou, Z., Qiao, N., Liu, C. and Shao, Z. (2009) *Alcanivorax hongdengensis* sp. nov., an alkane-degrading bacterium isolated from surface seawater of the straits of Malacca and Singapore, producing a lipopeptide as its biosurfactant. *Int J Syst Evol Microbiol*, **59**: 1474-1479.
- Yoon, J.-H., Kang, K. H., Yeo, S.-H. and Oh, T.-K. (2005) *Erythrobacter luteolus* sp. nov., isolated from a tidal flat of the Yellow Sea in Korea. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**, 1167–1170.
- Zhang, X.-H. and Austin, B. (2000) Pathogenicity of *Vibrio harveyi* to salmonids. *J Fish Dis* **23**, 93–102.
- Zhang, R., Wang, Y. and Gu, J-D. (2006) Identification of environmental plasmid-bearing *Vibrio* species isolated from polluted and pristine marine reserves of Hong Kong, and resistance to antibiotics and mercury. *Anton Leeuw Int J G* **89**, 307-315.

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES

Este estudo, pioneiro do ponto de vista da diversidade de bactérias revelada e da região geográfica estudada, gera um ponto de partida em relação à biologia, a ecologia microbiana e a farmacologia do zoantídeo *P. caribaeorum*. Conhecer e entender como a microbiota associada ao muco deste cnidário se posiciona dentro do complexo holobionte fornece subsídios para estudos futuros. As bactérias encontradas durante este estudo nos possibilitaram fazer algumas inferências acerca de suas participações nesse complexo simbiote composto pelo zoantídeo, seus microrganismos e suas zooxantelas. A partir deste estudo foi possível sugerir participações ecológicas relevantes para essas bactérias, como bactérias fixadoras de nitrogênio, bactérias capazes de degradar derivados do petróleo e bactérias que sintetizam toxinas e compostos antimicrobianos.

Esse estudo foi o primeiro no Brasil a tentar correlacionar o fenômeno do branqueamento a possíveis patógenos. Neste estudo apenas três linhagens do gênero *Pseudoalteromonas* foram exclusivamente encontradas no muco de colônias branqueadas, o que pode sugerir uma possível relação destas espécies com o branqueamento. Os resultados encontrados neste estudo concordam qualitativamente com os resultados obtidos por outros autores.

Um acompanhamento a médio-longo prazo permitiria identificar alterações na microbiota normal associada aos cnidários, somado-se a sintomas macroscópicos de doenças e de branqueamento. Esse tipo de estudo poderia revelar bactérias de origem humana, com origem da descarga de esgotos, associadas ao muco dos cnidários. Esse tipo de resultado pode comprovar que uma determinada área está sendo influenciada de forma direta pela ação antrópica.

Os recifes de Porto de Galinhas e de Suape, embora situados em municípios vizinhos, sofrem tipos de impactos distintos. Em Porto de Galinhas há uma forte influência do ecoturismo e em Suape há uma grande influência de material oriundo da ação portuária, por se localizar muito próximo ao porto de Suape. Essas duas áreas são críticas no que diz respeito ao estudo de levantamento da sua biodiversidade, seja animal, vegetal, ou bacteriana, já que são expostas a diferentes estresses ambientais. Por isso, um acompanhamento da microbiota desses ambientes se faz necessário. Para ilustrar, de Porto de Galinhas foi isolada a bactéria *Alcanivorax diseolei*. Esta bactéria é comumente

encontrada em áreas onde houve acidentes com navios petroleiros gerando grandes derramamentos de petróleo. Isso pode sugerir que a região onde foi coletado o muco contendo esta bactéria pode estar sendo afetada de algum modo por danos desta ordem, levando a proliferação desta bactéria.

Os desdobramentos dos recursos genéticos destas bactérias são inúmeros. Um segundo passo nesta linha de pesquisa, seria um estudo mais aprofundado dos genomas bacterianos e de suas possíveis implicações na indústria farmacêutica e biotecnológica. O muco de *P. caribaeorum* e de outras espécies de cnidários, assim como de outros invertebrados marinhos, continuam pouco estudados e representam uma fonte importante de potenciais novas espécies de bactérias e de seus genes.

Outros microrganismos, como Archaea e vírus, também fazem parte da microbiota de animais como os corais. Pesquisas voltadas para estes grupos são necessárias e podem apresentar informações inéditas e relevantes para a compreensão do complexo holobionte, bem como, das doenças que afetam os corais, uma vez que boa parte das doenças conhecidas são creditadas a fungos e bactérias.

Apesar dos zoantídeos serem animais semelhantes aos corais e tão abundantes quanto em muitos recifes de corais de todos os oceanos, pouco se sabe sobre sua microbiota. A grande maioria dos estudos que abordam este tema é voltada para os corais. Mas além de todos os outros invertebrados marinhos que são importantes componentes dos recifes, os cnidários têm outros grupos que também são pouco estudados deste ponto de vista. Os zoantídeos, as gorgônias, e os alcionáceos são conhecidos por possuírem importantes propriedades farmacológicas, mas apesar disso, pouco se sabe a respeito da sua microbiota. Sendo assim, é fundamental que pesquisas de diversidade microbiana se estendam para estes grupos, pois são espécies com potenciais para recursos biológicos com aplicações importantes.

REFERÊNCIAS

- Acosta, A. (2001) Disease in zoanths: dynamics in space and time. *Hydrobiologia* **460**, 113-130.
- Acosta, A. and Asbahr, M. (2000) Reproductive effort in *Palythoa caribaeorum*. *9th International Coral Reef Symp., Bali, Indonesia*, 295 pp.
- Ainsworth, T.D., Kramasky-Winter, E., Loya, Y., Hoegh-Guldberg, O. and Fine, M. (2007) Coral disease diagnostics: What's between a plague and a band? *Appl Environ Microbiol* **73**, 981–992.
- Ainsworth, T.D., Thurber, R.V. and Gates, R.D. (2009) The future of coral reefs: a microbial perspective. *Trends in Ecology and Evolution* **25** (4), 233-240.
- Al-Moghrabi, S. M. (2001) Unusual black band disease (BBD) outbreak in the northern tip of the Gulf of Aqaba (Jordan). *Coral Reefs* **19**, 330–331.
- Arboleda, M. and Reichardt, W. (2009) Epizoic communities of prokaryotes on healthy and diseased scleractinian corals in Lingayen Gulf, Philippines. *Microb Ecol* **57**, 117-128.
- Arotsker, L., Siboni, N., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E., Loya, Y. and Kushmaro, A. (2009) *Vibrio* sp. As a potentially important member of the Black Band Disease (BBD) consortium in *Favia* sp. Corals. *FEMS Microb Eco* **70**, 515-524.
- Babu, U.V., Bhandari, S.P.S. and Garg, H.S. (1997) Hariamide, a novel sulfated sphingolipid from a *Zoanthus* sp. Of the Indian coast. *J Nat Prod* **60**, 1307-1309.
- Banin, E., Israely, T., Kushmaro, A., Loya, Y., Orr, E. and Rosenberg, E. (2000) Penetration of the coral-bleaching bacterium *Vibrio shiloi* into *Oculina patagonica*. *Appl Environ Microbiol* **66** (7), 3031-3036.

- Banin, E., Sanjay, K.H., Naider, F. and Rosenberg, E. (2001) A proline-rich peptide from the coral pathogen *Vibrio shiloi* that inhibits photosynthesis of zooxanthellae. *Appl Environ Microbiol* **67**, 1536–1541.
- Banin, E., Vassilakos, D., Orr, E., Martinez, R.J. and Rosenberg, E. (2003) Superoxide dismutase is a virulence factor produced by the coral bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Curr Microbiol* **46**, 418-422.
- Barneah, O., Ben-Dov, E., Kramarsky-Winter, E. and Kushmaro, A. (2007) Characterization of black band disease in Red Sea stony corals. *Envir Microbiol* **9** (8), 1995–2006.
- Ben-Haim, Y., Banin, E., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg, E. (1999). Inhibition of photosynthesis and bleaching of zooxanthellae by the coral pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ Microbiol* **1**, 223-229.
- Bourne, D.G. and Munn, C.B. (2005) Diversity of bacteria associated with the coral *Pocillopora damicornis* from the Great Barrier Reef. *Envir Microbiol* **7** (8), 1162-1174.
- Bourne, D.G., Garren, M., Work, T.M., Rosenberg, E., Smith, G.W. and Harvell, D.C. (2009) Infectious disease and the coral holobiont. *Trends Microbiol* **17**, 554-562.
- Brown, B.E. and Ogden, J.C. (1993) Coral bleaching. *Scientific America* **268**, 64-70.
- Brown, B.E. and Bythell, J.C. (2005) Perspectives on mucus secretion in reef corals. *Mar Ecol Prog Ser* **296**, 291–309.
- Button, D.K., Schut, F., Ouang, P., Martin, R. and Robertson, B.R. (1993) Viability and isolation of marine bacteria by dilution culture: theory procedures and initial results. *Appl Environ Microbiol* **59**, 881–891.
- Carlton, R. and Richardson, L.L. (1995) Oxygen and sulphide dynamics in a horizontally migrating cyanobacterial mat: black band disease of corals. *FEMS Microbiol Ecol* **18**, 155–162.

Carpenter, K.E. et al. (2008) One-third of reef-building corals face elevated extinction risk from climate change and local impacts. *Science* **321**, 560–563.

Castro, A.P., Araújo Jr., S.D., Reis, A.M.M., Moura, R.L. et al. (2010) Bacterial community associated with healthy and disease reef coral *Mussismilia hispida* from eastern Brazil. *Microb Ecol* **50**, 658-667.

Castro, C.B. and Pires, D.O. (1999) A bleaching event on a Brazilian coral reef. *Rev Bras Oceanogr* **47**(1), 87-90.

Cervino, J.M., Hayes, R., Polson, S., Polson, S.C., Goreau, T.J., Martinez, R.J. and Smith, G.W. (2004) Relationship of *Vibrio* species infection and elevated temperatures to yellow blotch/band disease in Caribbean corals. *Appl Environ Microbiol* **70**, 6855–6864.

Chimetto, L.A., Brocchi, M., Thompson, C.C., Martins, R.C.R., Ramos, H.B. and Thompson, F.L. (2008) *Vibrios* dominate as culturable nitrogen-fixing bacteria of Brazilian coral *Mussismilia hispida*. *Syst Appl Microbiol* **31**, 312-319.

Chimetto, L.A., Brocchi, M., Gondo, M., Thompson, C.C., Gomez-Gil, B. and Thompson, F.L. (2009) Genomic diversity of *vibrios* associated with the Brazilian coral *Mussismilia hispida* and its sympatric zoanthids (*Palythoa caribaeorum*, *Palythoa variabilis* and *Zoanthus solanderi*). *J Appl Microbiol* **106**, 1818-1826.

Connell, J.H. (1978) Diversity in tropical rain forest and coral reef. *Science* **199** (4335), 1302-1310.

Costa, C.F. and Amaral, F.M.D. (2002) Density and size differences in zooxanthellae from five reef-building coral species from Brazil. *Proceed. 9th Intern. Coral Reef Symp.* Indonesian Institute of Sciences, Bali **1**:159-162.

Costa, C.F., Amaral, F.M.D. and Sassi, R. (2001) Branqueamento em *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) da praia de Gaibu, Pernambuco, Brasil. *Rev Nordestina Biol* **15**(1), 15-22.

- Costa, C.F., Coutinho, C.S., Sassi, R. and Brito, L.A.C. (2004) Microsymbionts of *Siderastrea stellata* (Cnidaria, Scleractinia) in coastal reefs of Cabo Branco, State of Paraíba, Northeastern Brazil. *Trop Oceanogr* **32**(2), 173-181.
- Costa Jr., O.S., Leão, Z.M.A.N., Nimmo, M. and Attrill, M.J. (2000) Nutrifcation impacts on coral reefs from Northern Bahia, Brazil. *Hydrobiologia* **440**, 307–316.
- Coffroth, M.A. (1983) Cyclical formation of mucus sheets by 3 coral species. *Am Zool* **23**, 960–960.
- Coffroth, M.A. (1990) Mucous formation on poritis corals: na evaluation of corals mucus as a nutrient source on reefs. *Marine Biology* **105**, 39-49.
- Cowan, D.A. Microbial genomes – the untapped resource. (2000) *Trends Biotechnol* **18**, 14-16.
- Daly, M. et al. (2007) The phylum Cnidaria: a review of phylogenetic patterns and diversity 300 years after Linnaeus. *Zootaxa* **166**, 127-182.
- Das, S., Lyla, P.S. and Khan, S.A. (2006) Marine microbial diversity and ecology: importance and future perspectives. *Current Science* **90**, 1325–1335.
- D'Elia, C.F., Buddemeier, R.W. and Smith, S.V. (1991) Workshop on coral bleaching, coral reef ecosystems and global changes. *Report of proceedings*. Maryland Sea Grant College, College Park, Md.
- Delong, E.F. and Karl, D.M. (2005) Genomic perspectives in microbial oceanography. *Nature* **437**, 336-342.
- Dinsdale, E.A., Edwards, R.A., Hall, D., Angly, F., Breitbart, M., Brulc, J.M., Furlan, M., Desnues, C. et al. (2008) Functional metagenomic profiling of nine biomes. *Nature* **452**, 629-632.
- Disalvo, L.H. and Gundersen, K. (1971) Regenerative functions and microbial ecology of coral reefs. I. Assays for microbial population. *Can J Microbiol* **17**, 1081–1089.

Ducklow, H. W. and Mitchell, R. (1979) Composition of mucus released by coral reef coelenterates. *Limnol. Oceanogr* **24**, 706-714.

Dutra, L.X.C., Kikuchi, R.K.P. and Leão, Z.M.A.N. (2000) Thirteen months monitoring coral bleaching on Bahia's north coast, Brazil. *Proceed. 9th Int. Coral Reef Symp* Indonesian Institute of Sciences, Bali, pp.373.

Eilers, H., Pernthaler, J., Glockner, F.O. and Amann, R. (2000) Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. *Appl Environ Microbiol* **66**, 3044–3051.

Ferreira, B.P. and Maida, M. (2006) Monitoramento dos recifes de coral do Brasil – situação atual e perspectivas. Ministério do Meio Ambiente, Secretaria de Biodiversidade e Florestas, Brasília.

Francini-Filho, R.B., Moura, R.L., Thompson, F.L., Reis, R.M., Kaufman, L., Kikuchi, R.K.P. and Leão, Z.M.A.N. (2008) Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Marine Pollution Bulletin* **56**, 1008-1014.

Frias-Lopez, J., Zerkle, A.L., Bonheyo, G.T. and Fouke, B.W. (2002) Partitioning of bacterial communities between seawater and healthy, black band disease, and dead coral surfaces. *Appl Environ Microbiol* **68** (5), 2214-2228.

Frolova, G.M., Kuznetsova, T.A., Mikhailov, V.V. and Eliakov, G.B. (2000) Immunoenzyme method for detecting microbial producers of palytoxin. *Bioorg Khim* **26**, 315-320.

Fuhrman, J. A. and Campbell, L. (1998) Microbial microdiversity. *Nature* **393**, 410–411.

Fukunaga, Y., Kurahashi, M., Tanaka, K., Yanagi, K., Yokota, A. and Harayama, S. (2006) *Pseudovibrio ascidiaceicola* sp. nov., isolated from ascidians (sea squirts). *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 343-347.

- Gates, R.D., Beghdasarian, G. and Muscatine, L. (1991) Temperature stress causes host cell detachment in symbiotic cnidarians: implications for coral bleaching. *Biol. Bull. (Woods Hole)* **182**, 324–332.
- Geffen, Y., Ron, E.Z. and Rosenberg, E. (2009) Regulation of release of antibacterials from stressed scleractinian corals. *FEMS Microbiol Lett* **295**, 103-109.
- Gleibs, S. and Mebs, S. (1999) Distribution and sequestration of palytoxin in coral reef animals. *Toxicon* **37**, 1521-1527.
- Glynn PW (1991) Coral reef bleaching in the 1980s and possible connections with global warming. *Trends in Ecology and Evolution* **6**, 175-179.
- Gontang, E.A., Fenical, W. and Jensen, P.R. (2007) Phylogenetic diversity of gram-positive bacteria cultured from marine sediments. *Appl Envir Microb* **73** (10), 3272-3282.
- Grace, K.J.S. and Jacobs, R.S. (1998) The anti-inflammatory and analgesic activities of zoanthamine, a new structural alkaloid from the toxic colonial zoanthid, *Zoanthus* sp. *FASEB J* **2**, A1109.
- Gram, L., Melchiorson, J. and Bruhn, J.B. (2010) Antibacterial activity of marine culturable bacteria collected from a Global Sampling of Ocean surface waters and surface swabs of marine organisms. *Mar Biotechnol* **12**, 439-451.
- Green, E.P. and Bruckner, A.W. (2000) The significance of coral disease epizootiology for coral reef conservation. *Biological Conservation* **96**, 347–361.
- Grygier, M.J. (1985) Lauridae: taxonomy and morphology of ascothoracid crustacean parasites of zoanths. *Bull Mar Sci.*, **36**, 278-303.
- Harvell, C.D., Kim, K., Burkholder, J.M., Colwell, R.R., Epstein, P.R., Grimes, E.E., et al. (1999) Emerging marine diseases-climate links and anthropogenic factors. *Science* **285**: 1505–1510.

Hoegh-Goldberg, O., and B. Salvant. (1995) Periodic mass bleaching and elevated sea temperatures: bleaching of outer reef slope communities in Moorea, French Polynesia. *Mar Ecol Prog Ser* **121**, 181–190.

Hubbard, J.A.E.B. and Pocock, Y.K. (1972) Sediment rejection by recent scleractinian corals: a key to palaeo-environmental reconstruction. *Geol Rdsch* **61**, 598-626.

Hughes, T.P. et al. (2003) Climate change, human impacts, and the resilience of coral reefs. *Science* **301**, 929–933.

Jatkar, A.A., Brown, B.E., Bythell, J.C., Guppy, R., Morris, N.J. and Pearson, J.P. (2010) Coral mucus: the properties of its constituent mucins. *Biomacromolecules* **11**, 883-888.

Jensen, P.R., Harvell, C.D., Wirtz, K. and Fenical, W. (1996) Antimicrobial activity of extracts of Caribbean gorgonian corals. *Mar Biol* **125**: 411–419.

Kaezmarsky, L.T. (2006) Coral disease dynamics in the central Philippines. *Diseases of Aquatic Organisms* **69**, 9–21.

Kalimutho, M., Ahmad, A. and Kassim, Z. (2007) Isolation, characterization and identification of Bacteria associated with mucus of *Acropora cervicornis* coral from Bidong Island, Terengganu, Malaysia. *Malaysian Journal of Science* **26** (2), 27-39.

Kaul, P.N., Farmer, M.R. and Ciereszko, L.S. (1974) Pharmacology of palitoxin: The most potent marine toxin known. *Proc West Pharmacol Soc* **17**, 294.

Kellogg, C.A. (2004) Tropical Archaea: diversity associated with the surface microlayer of corals. *Mar Ecol Prog Ser* **273**, 81-88.

Kelman, D., Kashman, Y., Rosenberg, E., Kushmaro, A. and Loya, Y. (2006) Antimicrobial activity of Red Sea corals. *Marine Biology* **149**, 357-363.

Kelman, D., Kushmaro, A., Loya, Y., Kashman, Y. and Benayahu, Y. (1998) Antimicrobial activity of a Red Sea soft coral, *Parerythropodium fulvum fulvum*: reproductive and developmental considerations. *Mar Ecol Prog Ser* **169**: 87–95.

- Khan, S.T., Takaichi, S. and Harayama, S. (2008) *Paracoccus marinus* sp. nov., an adonixanthin diglucoside-producing bacterium isolated from coastal seawater in Tokyo Bay. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 383-386.
- Klaus, J.S., Janse, I., Heikoop, J.M., Sandford, R.A. and Fouke, B.W. (2007) Coral microbial communities, zooxanthellae and mucus along gradients of seawater depth and coastal pollution. *Environ Microbiol* **9**, 1291–1305.
- Konstantinidis, K.T., Ramette, A. and Tiedje, J.M. (2006) The bacterial species definition in the genomic era. *Phil Trans R Soc B* **361**, 1929-1940.
- Koren, O. and Rosenberg, E. (2006) Bacteria associated with mucus and tissues of the coral *Oculina patagonica* in summer and winter. *Appl Environ Microbiol* **72** (8), 5254-5259.
- Kurahashi, M. and Yokota, A. (2002) A preliminary report of phylogenetic diversity of bacterial strains isolated from marine creatures. *J Gen Appl Microbiol* **48**, 251–259.
- Kuramoto, M. et al. (1998) Structure-activity relationship of norzoanthine exhibiting significant inhibition of osteoporosis. *Bull Chem Soc Jpn* **71**, 771-779.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P., Maia, M.P. and Lago, R.A.L. (1997) A catastrophic coral cover decline since 3000 years B.P., northern Bahia, Brazil. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium* **1**, 583–588.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P. and Oliveira, M.D.M. (2008) Branqueamento de corais nos recifes da Bahia e sua relação com eventos de anomalias térmicas nas águas superficiais do oceano. *Biota Neotropica* **8** (3), 69-82.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P. and Testa, V. (2003) Corals and Coral Reefs of Brazil. In *Latin America Coral Reefs* ed. Cortês J. pp.9-52. Amsterdam: Elsevier Publisher.
- Lesser, M.P. et al. (2004) Discovery of symbiotic nitrogen-fixing cyanobacteria in corals. *Science* **305**, 997–1000.

- Lewis, J.B. and Price, W.S. (1976) Patterns of ciliary currents in Atlantic reef corals and their functional significance. *J Zool Lond* **178**, 77-89.
- Lins-De-Barros, M.M. et al. (2010) Archaea, bacteria, and algal plastids associated with the reef-building corals *Siderastrea stellata* and *Mussismilia hispida* from Búzios, South Atlantic Ocean, Brazil. *Microbiol Ecol* **59**, 523-532.
- Marques, A.C. and Collins, A.G. (2004) Cladistic analysis of Medusozoa and cnidarians evolution. *Invertebrate Biology* **123** (1), 23-42.
- Martin-Cuadrado, A.B., Lopez-Garcia, P., Alba, J.C., Moreina, D., Strittmatter, A. et al. (2007) Metagenomics of the deep Mediterranean, a warm Bathypelagic habitat. *PLoS ONE* **2**, e914.
- Mayal, E.M. and Pinto, C.S. (1999) Monitoring of the bleaching in corals of the Atol das Rocas, Brazil. *International Conference on Scientific Aspects of Coral Reef Assessment, Monitoring, and Restoration*. Fort Lauderdale, Florida, 131 pp.
- Menezes, C.B.A. et al. (2010) Microbial diversity associated with algae, ascidians and sponges from the North coast of São Paulo state, Brazil. *Microbiological Research* **165**, 466-482.
- Migotto, A.E. (1997) Anthozoan bleaching on the southeastern coast of Brazil in the summer of 1994. *Proc. Intern. Conference on Coelenterate Biology*, **6**, ICCB, Leeuwenhorst, 329-335.
- Monks, N.R., Lerner, C., Henriques, A.T., Farias, S.M., Schapoval, E.E.S., Suyenaga, E.S., Da Rocha, A.B., Schwartzmann, G. and Mothes, B. (2002) Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. *J Exp Mar Biol Ecol* **2**, 1–1.
- Moore, R.E. and Bartolini, G. Structure of palytoxin. (1981) *J Am Chem Soc* **103**, 2491–2494.
- Moore, R.E. and Scheuer, P.J. (1971) Palytoxin: A new marine toxin from a coelenterate. *Science* **172**, 495-496.

- Moura, R.L. (2003) Brazilian reefs as priority areas for biodiversity conservation in the Atlantic Ocean. *Proc Int Coral Reef Symp* **9**, 917–920.
- Neves, E.G., Da Silveira, F.L., Johnsson, R. and Longo, L.L. (2002) Shallow-water scleractinian corals and zoanthids from reefs of Coroa Grande, Pernambuco State, Brasil. *Biociências* **10** (2), 127-145.
- Nithyanand, P. and Pandian, S.K. (2009) Phylogenetic characterization of culturable bacterial diversity associated with the mucus and tissue of the coral *Acropora digitifera* from the Gulf of Mannar. *FEMS Microbiol Ecol* **69** (3), 384-394.
- Norse, E.A. (1993). Global marine biological diversity. A strategy for building conservation into decision making: i-xxxii. 1-383. Washington, D.C.: Island Press.
- Oliveira, M.D.M., Kikuchi, R.K.P., Leão, Z.M.A. and Dutra, L.X.C. (2004) Coral bleaching in Brazil, Western South Atlantic. *10th Intern. Coral Reef Symp. Japoneze Coral Reef Society, Okinawa*, pp.406.
- Pantos, O., Cooney, R.P., Le Tissier, M.D.A., Barer, M.R., O'donnell, A.G. and Bythell, J.C. (2003) The bacterial ecology of a plague-like disease affecting the Caribbean coral *Montastrea annularis*. *Envir Microbiol* **5**, 370-382.
- Patterson, K.L., Porter, J.W., Ritchie, K.B., Polson, S.W., Mueller, E., Peters, E.C., Santavy, D.L. and Smith, G.W. (2002) The etiology of white pox a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Science*, **99**, 8725–8730.
- Pérez, C.D., Vila-Nova, D.A. and Santos, A.M. (2005) Associated community with the zoanthid *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860) (Cnidaria, Anthozoa) from littoral of Pernambuco, Brazil. *Hydrobiologia* **548**, 207-215.
- Peters, E.C. (1981) Bioaccumulation and histopathological effects of oil on stony corals. *Mar Pollut Bull* **12**, 333–339.

- Raina, J-B. et al. (2009) Coral-associated bacteria and their role in the biogeochemical cycling of sulfur. *Appl Environ Microbiol* **75**, 3492– 3501.
- Reis, A.M.M., Araújo Jr, S.D., Moura, R.L., Francini-Filho, R.B., Pappas Jr, G., Coelho, A.M.A., Krüger, R.H. and Thompson, F.L. (2009) Bacterial diversity associated with the Brazilian endemic reef coral *Mussismilia braziliensis*. *J App Microbiol* **106**, 1378-1387.
- Richardson, L.L. (1998) Coral diseases: what is really known? *TREE* **13**, 438-443.
- Richardson, L.L. and Aronson, R. Infectious diseases of coral reefs. (2002) *Proceedings of the 9th International Coral Reef Symposium* **1**, Bali, Indonesia, 1225-1230.
- Ritchie, K.B. (2006) Regulation of microbial populations by coral surface mucus and mucus-associated bacteria. *Mar Ecol Progr Ser* **322**, 1-14.
- Ritchie, K.B. and Smith, G.W. (1995) Preferential carbon utilization by surface bacterial communities from water mass, normal and white-band diseased *Acropora cervicornis*. *Mol Mar Biol Biotechnol* **4**, 345–352.
- Rohwer, F., Breitbart, M., Jara, J., Azam, F. and Knowlton, N. (2001) Diversity of bacteria associated with the Caribbean coral *Montastrea franksi*. *Coral Reefs* **20**, 85-91.
- Rohwer, F., Seguritan, V. and Knowlton, N. (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar Ecol Prog Ser* **243**, 1-10.
- Rosenberg, E. and Bem-Haim, Y. (2002) Microbial diseases of corals and global warming. *Enviro Microbiol* **4**, 318-326.
- Rosenberg, E., Koren, O., Reshef, L., Efrony, R. and Zilber-Rosenberg, I. (2007) The role of microorganism in coral health, disease and evolution. *Nat Rev Microbiol* **5**, 355-362.
- Ryland, J.S. and Lancaster, J.E. (2003) Revision of methods for separating species of *Protopalythoa* (Hexacorallia, Zoanthidea) in the tropical West Pacific. *Invertebrate Systematics* **17**, 407-428.

- Santavy, D.L. and Peters, E.C. (1997) Microbial pest: coral disease in the Western Atlantic. *Proc 8th Int Coral Reefs Symp STRI, Panamá*, **1**, 607-612.
- Sebens, K.P. (1982) Intertidal distribution of zoanths on the Caribbean coast of Panama: effects of predation and dessication. *Bull Mar Sci* **32**, 316-335.
- Seemann, P., Gernert, C., Schmitt, S., Mebs, D. and Hentschel, U. (2009) Detection of hemolytic bacteria from *Palythoa caribaeorum* (Cnidaria, Zoantharia) using a novel palytoxin-screening assay. *Anton Leeuw Int J G.*
- Sfanos, K., Harmody, D.K., Mccarthy, P.J., Dang, P., Pomponi, S.A. and Lopez, J.V. (2005) A molecular systematic survey of cultured microbial associates of deep water marine invertebrates. *Syst Appl Microbiol* **28**, 242-264.
- Soares, C.L.S., Pérez, C.D., Maia, M.B.S., Silva, R.S. and Melo, L.F.A. (2006) Avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato bruto hidroalcoólico do zoantídeo *Palythoa caribaeorum* (Duchassaing & Michelotti, 1860). *Rev Bras Farmacogn* **16** (4), 463-468.
- Sorokin, Y.I. (1973) Tropical role of bacteria in the ecosystem of the coral reef. *Nature* **242**, 415-417.
- Souter, D.W. and Lindén, O. (2000) The health and future of coral reef systems. *Ocean & Coastal Management* **43**, 657-688.
- Suchanek, T. H. and Green, D. J. (1981) Inter-specific competition between *Palythoa caribaeorum* and other sessile invertebrates on St. Croix reefs, U.S. Virgin Islands. *Proceedings of the 8th International Coral Reef Symposium 4* **2**, 679-684.
- Sussman, M., Mieog, J.C., Doyle, J., Victor, S., Willis, B.L. and Bourne, D.G. (2009). *Vibrio* zinc-metalloprotease causes photoinactivation of coral endosymbionts and coral tissue lesions. *PLoS ONE* **4**, e4511.
- Sutherland, K., Porter, J. and Torres, C. (2004) Disease and immunity in Caribbean and Indo-Pacific zooxanthellae corals. *Mar Ecol Prog Ser* **266**, 273–302.

- Taniyama, S., Mahmud, Y., Terada, M., Takatani, T., Arakawa, O. and Noguchi, T. (2002) Occurrence of a food poisoning incident by palytoxin from a serranid *Epinephelus* sp. In Japan. *J Nat Toxins* **11**, 277-282.
- Toren, A., Landau, L., Kushmaro, A., Loya, Y. and Rosenberg, E. (1998) Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Appl Environ Microbiol* **64**, 1379–1384.
- Ukena, T., Satake, M., Usami, M., Oshima, Y., Naoki, H., Fujita, T., Kan, Y. and Yasumoto, T. (2001) Structure elucidation of ostreocin D, a palytoxin analog isolated from the dinoflagellate *Ostreopsis siamensis*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* **65**, 2585–2588.
- Vandamme, P. and De Ley, J. (1991) Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *Int J Syst Bacteriol* **41**, 451–455.
- Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G., Van Etterijck, R., Vlaes, L., Kersters, K., Butzler, J.P., Lior, H., and Lauwers, S. (1992) Outbreak of recurrent abdominal cramps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J Clin Microbiol* **30**, 2335–2337.
- Wegley, L., Edwards, R., Rodriguez-Brito, B., Liu, H. and Rohwer, F. (2007) Metagenomic analysis of the microbial community associated with the coral *Porites astreoides*. *Environ Microbiol* **9**, 2707-2719.
- Weil, E., Smith, G., and Gil-Agudelo, D.L. (2006) Status and progress in coral reef disease research. *Dis Aquat Org* **69**, 1–7.
- Wilkinson, C. (2008) Status of Coral Reefs of the World ed. Wilkinson, C. *Global Coral Reef Monitoring Network and Reef and Rainforest Research Center*, pp. 296.
- Zobell, C. (1946) Marine microbiology, a monograph on hydrobacteriology. pp. 240 *Chronica Botanica Company, Waltham, MA*.

ANEXOS

Tabela 2 – Sequências das bactérias encontradas no muco de *Palythoa caribaeorum*

Sequência	Grupo	Espécie melhor relacionada no GenBank	Número de Acesso	% identidade
<u>Porto de Galinhas</u>				
<u>Colônia Normal</u>				
PP ABRIL 1D(47)	Actinobacteria	<i>Micrococcus</i> sp.	AM988873.1	94%
PP ABRIL 1F(9)	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	EU704697.1	98%
PP MAIO 8E(79)	Actinobacteria	<i>Micrococcus luteus</i>	FJ229461.1	98%
PP ABRIL 5E(34)	Actinobacteria	<i>Rhodococcus corynebacterioides</i>	AY837749.1	98%
SUP ABRIL 16B(27)	Actinobacteria	<i>Nesterenkonia</i> sp.	AY914064.1	92%
PP MAIO 8D(28)	Actinobacteria	<i>Brevibacterium</i> sp.	EU333129.1	96%
PP ABRIL 1G(6)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	AY030314.1	92%
PP ABRIL 5F(68)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	G0129898.1	95%
PP OUT 6B(67)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas ruthenica</i>	NR_025140.1	90%
PP MAIO 1A(1)	γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	AY683531.1	97%
PP MAIO 1C(46)	γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	GQ153642.1	92%
PP MAIO 5E(20)	γ -Proteobacteria	<i>Alcanivorax dieselolei</i>	AB453732.1	93%
PP MAIO 1D(7)	γ -Proteobacteria	<i>Photobacterium</i> sp.	AB511030.1	95%
PP MAIO 1F(40)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	GQ215068.1	90%
PP JULHO 5A(54)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	GU223596.1	93%
PP JULHO 5B(55)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	AY030314.1	94%
PP JULHO 1I(58)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio alginolyticus</i>	FN436276.1	93%
SUP MAIO 6C(5)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio communis</i>	GU078671.1	92%
PP OUT 4A(73)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio proteolyticus</i>	AF513463.1	91%
PP JULHO 1A(38)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	X74706.1	90%
PP JULHO 1C(35)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ455007.1	94%

PP JULHO 5E(39)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ455007.1	94%
PP OUT 4M(66)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	FJ457590.1	94%
PP OUT 5D(61)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	AB512471.1	95%
PP OUT 6A(76)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	GQ455007.1	94%
SUP MAIO 6D2(75)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	GU262992.1	96%
SUP MAIO 1A(2)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	FM204867.1	96%
SUP ABRIL 3C(8)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudomonas putida</i>	DO387442.1	97%
SUP ABRIL 13A(15)	Firmicutes	<i>Bacillus pumilus</i>	FJ613542.1	96%
SUP OUT 4A(62)	Firmicutes	<i>Bacillus</i> sp.	DQ448794.1	89%
PP ABRIL 3(72)	α -Proteobacteria	<i>Pseudovibrio denitrificans</i>	NR029112.1	96%
PP MAIO 1E(16)	α -Proteobacteria	<i>Pseudovibrio</i> sp.	FN295808.1	85%
PP MAIO 5A(69)	α -Proteobacteria	<i>Stappia alba</i>	AJ889010.1	97%
PP MAIO 1B(70)	α -Proteobacteria	<i>Stappia marina</i>	AY628423.1	97%
PP MAIO 8F(32)	α -Proteobacteria	<i>Alterierythro bacter</i> sp.	EU726272.1	91%
SUP ABRIL 3D(26)	α -Proteobacteria	<i>Paracoccus marinus</i>	AB185959.1	94%
<u>Colônia Branqueada</u>				
PP OUT 1D(78)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	GU108556.1	94%
PP OUT 1E(64)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	AB512475.1	95%
PP OUT 2B(71)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio communis</i>	GU078670.1	96%
PP OUT 2E(65)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio communis</i>	GU078673.1	95%
<u>Suaape Colônia Normal</u>				
PP 6C SUAPE(49)	γ -Proteobacteria	<i>Photobacterium</i> sp.	GQ215066.1	90%
SUP 1A SUAPE(22)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	GU223583.1	95%
SUP 6D SUAPE(18)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio communis</i>	GU078675.1	94%
PP 6B SUAPE(12)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio communis</i>	GU078670.1	95%
PP 3D SUAPE(14)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	AB512467.1	94%

Colônia
Branqueada

PP 1BA SUAPE(52)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas rubra</i>	FJ457185.1	94%
PP 3C SUAPE(51)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio harveyi</i>	DQ304558.1	93%
PP 3E SUAPE(50)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio</i> sp.	AM930485.1	91%
SUP 2A SUAPE(41)	γ -Proteobacteria	<i>Pseudoalteromonas piscida</i>	AB090233.1	92%
SUP 2B SUAPE(29)	γ -Proteobacteria	<i>Vibrio alginolyticus</i>	FM204870.1	93%

Normas Editoriais da Revista



Journal of Applied Microbiology

© 2011 The Society for Applied Microbiology



Edited By: A. Gilmour

Impact Factor: 2.098

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2009: 57/94 (Microbiology); 68/150 (Biotechnology & Applied Microbiology)

Online ISSN: 1365-2672

Associated Title(s): Letters in Applied Microbiology

MANUSCRIPT PREPARATION AND PRESENTATION

Manuscripts should be drafted as concisely as possible. As space in the Journal is at a premium, the Editors always reserve the right to require authors to reduce the length of their manuscripts. Manuscripts will not be reviewed unless the English is of a publishable standard.

It is strongly recommended that you use the author submission checklist to help you to prepare your submission to the Journal.

The main text of the manuscript should be prepared as a Word document (.doc) or Rich Text Format (.rtf) file. Text must be double-spaced, and the pages of the manuscript must be numbered consecutively.

The title page should show the title of the manuscript; the names of authors and place(s) where the work was done; an abbreviated running headline not exceeding 35 letters and spaces; and the complete contact details for the corresponding author.

Original Articles should contain the following sections in this order:

- **ABSTRACT:** A brief summary of about 150-200 words, should give the major findings of the investigation under the following four headings: Aims; Methods and Results; Conclusions; Significance and Impact of Study. A list of between five and eight keywords should be added;
- **INTRODUCTION:** A balance must be struck between the pure and applied aspects of the subject;

- **MATERIALS AND METHODS:** Ensure that the work can be repeated according to the details provided. By submission of a manuscript, the authors consent that biological material, including plasmids, viruses and microbial strains, unobtainable from national collections will be made available to members of the scientific community for non-commercial purposes subject to national and international regulations governing the supply of biological material. In the case of a new diagnostic PCR, you should consider the need for an internal amplification control (JAM 2004 96(2):221; available here).
- **RESULTS:** Well-prepared tables and figures must be a cardinal feature of the 'Results' section because they convey the major observations to readers who scan a paper. Information provided in tables and figures should not be repeated in the text, but focus attention on the importance of the principal findings of the study. In general, journal papers will contain between one and seven figures and tables;
- **DISCUSSION:** This must not recapitulate the results and authors must avoid the temptation of preparing a combined 'Results and Discussion' section;
- **ACKNOWLEDGEMENTS:** Contributors who do not qualify as authors should be acknowledged and their particular contribution described. All sources of funding for the work reported, for all the authors, must be acknowledged. Both the research funder and the grant number (if applicable) should be given for each source of funds;
- **REFERENCES;**
- **SUPPORTING INFORMATION** (if applicable): Authors wishing to submit supporting information (such as multimedia adjuncts, large data sets, extra colour illustrations, bibliographies or any other material for which there is insufficient space in the print edition of the Journal) must do so at the time of first submission. This supporting information is an integral part of the article and will be reviewed accordingly. The availability of supporting information should be indicated in the main manuscript by a section headed 'Supporting Information', under which should be appropriate legends for the material.

References

The Harvard system should be used. Citation of references having three or more names should be cited in the text as Jones et al. (1992) at the first and subsequent times of quoting the reference. A series of references should be given in ascending date order (Green and Smith 1946; Jones et al. 1956). Names with the prefixes de, do van, von, etc. will be placed in alphabetical order of the first letter of the prefix, e.g. von Braun would appear under 'V'. Different publications having the same author(s) and year will be distinguished by, for example, 1992a, 1992b. Papers or other publications having no obvious author(s) should usually be cited as 'Anon.' with the year in the text and bibliography. Web sites should be quoted in the text with an access date. Abbreviate journal titles according to Index Medicus (http://www.nlm.nih.gov/tsd/serials/terms_cond.html). Personal communications should be cited in the text with initials and family name of all individuals.

The following is an example of order and style to be used in the manuscript:

Fricker, C.R. (1995) Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water. In Protozoan Parasites in Water ed. Betts, W.B., Casemore, D., Fricker, C.R., Smith, H.V. and Watkins, J. pp.91-96. London: The Royal Society of Chemistry.

Garner, J.S. and Favero, M.S. (1985) *Guidelines for Handwashing and Hospital Environment Control*. US Public Health Service, Centers for Disease Control HHS No. 99-117. Washington DC: Government Printing Office.

Laverick, M.A., Wyn-Jones, A.P. and Carter, M.J. (2004) Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage. *Lett Appl Microbiol* **39**, 127-135.

Tables

Tables must be prepared using the same word processing package as the manuscript text. They should not be embedded but be placed immediately following the main text. Do not submit tables separately. Tables must not include ruled vertical or horizontal lines with the exception of headers and a footer (see example). The use of explanatory footnotes is permissible and they should be marked by the following (shown in order of preference): *, †, ‡, §, , **, †† etc. For an example of table style, click [here](#).

Figures

Figures may be uploaded to the online submission site as separate files or included within the main manuscript file following the text and tables. Authors are advised that poor quality figures may delay the publication of their paper. Symbols or keys representing data series in graphs and charts must not be shown on the figure itself but be included in the legend typed on a separate sheet. For an example of figure style, click [here](#).

Photographs must be of good quality and high contrast. The magnification must be indicated by adding a bar representing a stated length. Composite photographs can reduce the numbers that require publication. The Journal will not accept figures illustrating SDS-PAGE and agarose gels, with multiple lanes, where lane order has been rearranged using digital imaging software. The figure should also show sufficient of the gel to reveal reference markers (e.g. the sample origin and a tracker dye, or a lane of molecular mass markers).

Please save line art (vector graphics) in encapsulated PostScript (EPS) format. Photographic images should be saved as Tagged Image Format Files (TIFF). Please indicate any form of file compression used (e.g. Zip). Detailed information on the submission of electronic artwork can be found at: <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

Colour figures

Online-only colour in figures is free of charge, however it is essential in these cases that the figure legends apply equally well to both printed greyscale and online colour versions, and do not specifically refer to the colour. Alternatively you can opt to pay for colour in the print and online versions. If your paper is accepted and you have opted for colour in print and online, we will need a completed Colour Work Agreement Form. This form can be downloaded as a PDF from http://www.blackwellpublishing.com/pdf/JAM_CWAF.pdf and should be sent to the Managing Editor on acceptance.

English usage, abbreviations and units

Use 'z' spelling where possible, except analyse, dialyse, hydrolyse, etc.; sulfur, sulfate, etc. When using numbers in the text, one to nine should be written in full and 10 and above should be written as numerals. The Journal uses SI units: g l⁻¹ not g/l; d, h, min, s (time units) but week and year in full; mol l⁻¹ (not M or N); probability is P; centrifugation conditions relative to gravity (**g**). Please refer to the Biochemical Journal 'Instructions to Authors' www.biochemj.org/bj/bji2a.htm.

Please click [here](#) for some examples of common abbreviations used in the Journal.

Microbial nomenclature

The Latin binomial name of micro-organisms, plants and animals (other than farm animals) must be given at first mention in the text; thereafter the generic name will be abbreviated in such a way that confusion is avoided when dealing with several genera all beginning with the same letter, viz. *Pseudomonas*, *Proteus*, *Pediococcus*, etc. (see list of abbreviations below). Subspecies are italicized (*Corynebacterium diphtheriae* subsp. *mitis*); groups and types are printed in Roman and designated by capital letters or Arabic figures (e.g. *Staphylococcus aureus* group A). Common names will not have an initial capital letter nor will they be underlined in the manuscript, viz. pseudomonad, salmonellas.

The specific name will be given in full in the captions to tables and figures. Major ranks are written in Roman with an initial capital (e.g. Enterobacteriaceae).

Please click [here](#) for a list of abbreviations currently in use for common generic names and for notes on referring to plant pathogenic bacteria.

Gnotobiotic animals

The terminology for describing the environmental status of animals in gnotobiotic experiments has established itself by usage. *Germ-free* implies freedom from any detectable microorganisms or viruses and it is limited by the tests used to detect contaminants. *Conventional animals* have a full complement of associated microbes. *Open conventional animals* are housed in a standard animal house. *Isolator conventional animals* are maintained in isolators and associated with full flora. *Ex-germ-free* animals are those with an associated flora which have become conventional.

Statistics

Tests must be presented clearly to allow a reader with access to the data to repeat them. Statistical tests used in the study should be clearly indicated in the Materials and Methods section. It is not necessary to describe every statistical test fully, as long as it is clear from the context what was done. In particular, null hypotheses should be clearly stated.

Authors are urged to give consideration to the assumptions underlying any statistical tests used and to assure the reader that the assumptions are at least plausible. Authors should be prepared to use nonparametric tests if the assumptions do not seem to hold.

Footnotes

Not permitted other than on the first page of a manuscript where they are used to show the author's change of address and the address for correspondence.

Experimental hazards

Chemical or microbiological hazards that may be involved in the experiments must be explained. Authors should provide a description of the relevant safety precautions adopted or cite an accepted 'Code of Practice'.

English-language editing service

Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found [here](#). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.