



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO

CAMILE DIAS AVELINO

INCIDÊNCIA, PREVALÊNCIA E PROGRESSÃO DE DOENÇAS EM
CORAIS DE RECIFES RASOS NO NORDESTE DO BRASIL

CAMPINA GRANDE – PB

2020

CAMILE DIAS AVELINO

**INCIDÊNCIA, PREVALÊNCIA E PROGRESSÃO DE DOENÇAS EM CORAIS DE
RECIFES RASOS NO NORDESTE DO BRASIL**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Área de concentração: Biodiversidade e Conservação em Ecossistemas Terrestres e Aquáticos

Orientador(a): Prof^ª. Dr^ª. Thelma Lúcia Pereira Dias

CAMPINA GRANDE

2020

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

A948i Avelino, Camile Dias.

Incidência, prevalência e progressão de doenças em corais de recifes rasos no nordeste do Brasil [manuscrito] / Camile Dias Avelino. - 2020.

65 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) - Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2020.

"Orientação : Profa. Dra. Thelma Lúcia Pereira Dias, Departamento de Biologia - CCBS."

1. Siderastrea stellata. 2. Recifes tropicais. 3. Doenças em corais. 4. Patógenos. I. Título

21. ed. CDD 577.6

CAMILE DIAS AVELINO

**INCIDÊNCIA, PREVALÊNCIA E PROGRESSÃO DE DOENÇAS EM CORAIS DE
RECIFES RASOS NO NORDESTE DO BRASIL**

Trabalho de Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de mestre em Ecologia e Conservação.

Área de concentração: Biodiversidade e Conservação em Ecossistemas Terrestres e Aquáticos

Aprovada em: 30 de abril de 2020.

BANCA EXAMINADORA

Thelma Lúcia Pereira Dias

Profa. Dra. Thelma Lúcia Pereira Dias (Orientadora)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

Michelle Gomes Santos

Dra. Michelle Gomes Santos
Profª Associada-UFCC
SIAPF 1439820

Profa. Dra. Michelle Gomes Santos (Membro Externo)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)

Anne Isabelley Gondim

Profa. Dra. Anne Isabelley Gondim de Farias (Membro Interno)
Universidade Federal da Paraíba (UFPB)

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Aruanan, minha mãe Gislene e aos meus irmãos Rafael e Bernardo; agradeço pelo apoio, pela companhia, pelo suporte, pelo amor e por sempre me ouvirem quando eu estava horas a fio falando de biologia e do quanto eu amo meus corais. Agradeço por me apoiarem e sempre, não interessa quão longe, me incentivarem a ir cada dia mais longe e mais pra cima. Nada do que foi feito, seria feito com tanto amor quanto foi, se eu não tivesse vocês na minha vida.

À minha companheira de jornada, e minha amiga para todas as horas Stella, que me aguenta por viagens, mesmo quando eu a deixava em casa sozinha para ir trabalhar, e ela acampava na minha mala para me lembrar que ela nunca foi só uma gata normal, era meu apoio e minha filha. Obrigada por várias madrugadas dormindo na minha perna enquanto eu trabalhava e analisava dados ou lia artigos.

À minha orientadora Thelma Lúcia e meu orientador onorário, Luis Carlos (aka. Pop), eu não tenho mais como agradecer por tanto. Profs, obrigada por até aqui me dar sempre um empurrão ou mesmo um pezinho. Por acreditar na minha capacidade como pesquisadora desde o início da graduação e por confiar no que eu gostaria de estudar e criar, sempre me mostrando os melhores caminhos. Em todos esses 7 anos de parceria, obrigada por ser sempre mais que minha orientadora, mas uma grande companheira, amiga e confidente. Ao Pops, obrigada pelo carinho que sempre recebi de graça. Pelas aulas de mergulho, pelos almoços, conversas sobre ficção e pelo System of a down no último volume no carro para testar o som novo do carro. Obrigada por ser um amigo e um professor de tantas coisas da vida.

À minha cobaia de orientação e amiga, Juci; obrigada pela paciência com meus erros de primeira vez orientando, obrigada a Thelma e à você por confiarem em mim essa responsabilidade. Agradeço pela proximidade e por nos tornarmos amigas muito além do laboratório e das coletas, sou muito grata de poder te ajudar e poder te ver crescer.

À minha amiga da nova geração do LBMar, Letícia, muito obrigada pelo carinho gratuito, pelo seu senso de justiça e seu incrível jeito de ajudar as pessoas. Você brilha, e eu espero te ver cada dia mais, de preferência, bem de pertinho, medindo peixe e contando corais.

Aos meus amigos de laboratório, antigos e novos, Loris, Rafa, Romilda, Kallyne, Jessika, Gustavo e todo o LBMar por ser meu lugar feliz no mundo. O ponto mais próximo do oceano em terra firme.

Ao meu amigo, minha família e meu companheiro de vida Alisson, meu muito obrigada por me conhecer em uma fase muito difícil e ter a paciência de entender e ficar perto sabendo

exatamente o que a profissão me puxa. Obrigada pelo estímulo diário e compartilhar, e, acreditar nos nossos sonhos tanto quanto eu acredito. Essa é mais um passinho para tantas coisas belas que temos planejadas. Obrigada por me dar Alice também, por quem eu quero ainda mais que tudo seja perfeito para o futuro brilhante dela e do planeta.

Ao meu amigo e companheiro de jornada acadêmica Marllon, fácil ou difícil (muito mais difícil do que fácil), obrigada pelos surtos compartilhados e por saber que tenho alguém que sabe exatamente o quanto essa escolha puxa da gente. Obrigada por estar comigo desde o primeiro dia de graduação e sempre.

Aos meus amigos Caio, Matthews, Rhian, Steffany e Katiane; obrigada por estarem sempre por perto, independente da vida ter levado cada um para o seu caminho... E que caminhos!

A Carol, por ser companheira fiel de coleta a noitada, por me puxar para cima quando eu pensava não conseguir mais, obrigada por aguentar cada falta minha, cada sumiço e cada alegria. Sem você, não teria tanto amor nessa dissertação. Ao meu pedacinho Thayse, que foi para Natal e nunca deixou faltar uma palavra de apoio, uma surpresa e ótimas vibrações pra mim, meu eterno agradecimento. Não sou muita coisa sem vocês.

A Vivi, minha amiga de tantos carnavais, minha companheira e minha confidente, obrigada por tanto. Às minhas gêmeas Nathalia e Nayara, pelo carinho, por me alimentarem quando a correria não deixava, e pelo amor sempre dado, esse trabalho é fruto de tudo isso.

À Nívea, agradeço por sempre ser presente e comemorar junto comigo as felicidades e entender os sumiços dessa vida. Agradeço ainda o cuidado comigo, e me apoiar seja mentalmente quanto fisicamente cortando só Deus sabe quantos cubinhos de madeira para a parte da histologia. À Jádira, agradeço a parceria, a maturidade e as maravilhosas conversas, seja longe ou perto.

Quero agradecer ainda às partes tão importantes para a realização desse trabalho, como os barqueiros de Pitimbu Seu Nego e Lucas, pai e filho que sempre me garantiram segurança para a melhor realização possível deste trabalho. Ao meu barqueiro no Seixas, Seu Iran, pela parceria que vai longe e que foi possível para a realização de toda a pesquisa e segue conosco.

Ao professor Cassiano Nonaka do Laboratório de Patologia do Departamento de Odontologia pela paciência, dedicação e carinho com que fui tratada por ele e por todos do laboratório, na elaboração das lâminas do segundo capítulo e nas palavras de encorajamento ao tentar algo novo. Aproveito ainda e agradeço às técnicas do laboratório Denise e Ana Luzia, por toda a paciência e a alegria com que me ajudaram na realização do trabalho.

À Eli, do laboratório de botânica, pela luz que trouxe para a parte de histologia quando

tudo estava mais do que apagado; meu eterno muito obrigada.

Aos professores do PPGEC, ao secretário e os colegas de sala, agradeço imensamente.

Aos professores da banca da qualificação e defesa, meu sincero agradecimento pelo tempo e pelas contribuições.

É com muita felicidade que encerro essa etapa tendo todos vocês por perto. Minha sincera gratidão à todos.

RESUMO GERAL

As doenças em corais se tornaram conhecidas a partir dos anos 1970, com a classificação da doença da Banda Negra. Após as primeiras descrições, cerca de outras vinte doenças foram catalogadas e descritas para os mais diversos oceanos ao redor do mundo nos 45 anos que se seguiram. Porém, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos de transmissão e modo de desenvolvimento dessas doenças, a que nível atingem os corais, geneticamente e citologicamente. Dessa forma, este trabalho esperou contribuir com questões a respeito desse desenvolvimento, considerando a prevalência e a incidência de doenças encontradas no nordeste do Brasil, em indivíduos do coral pétreo *Siderastrea stellata* e o modo como são afetadas interna e externamente. Através dos estudos de monitoramento, observou-se a dominância de duas doenças anteriormente registradas para o Atlântico sul, a doença da praga branca e a banda vermelha. Ambas demonstraram alta taxa de mortalidade com taxas ultrapassando os 40% de indivíduos mortos nas duas áreas estudadas. Além disso, as doenças foram vistas como doenças de progressão rápida, evoluindo em média 4,5 cm²/mês de necrose tecidual. Quando analisadas ao nível histológico, os tecidos demonstraram ainda sinais de desova fora de época e necrose em diversos estágios, além de colônias de bactérias e fungos. Foram ainda observados a presença de epibiontes entre os tecidos, como foi o caso das cianobactérias e diatomáceas. Com o trabalho, conclui-se que o monitoramento dessas doenças deve ser efetivo, e as medidas protetivas cada dia mais implementadas. Os corais que apresentam os sintomas das doenças são somente uma porcentagem de tudo que está realmente doente. Deve-se traçar rotas de remediação e mitigação na tentativa de evitar a perda prematura de áreas de recifes de corais, em especial aqueles com alta taxa de endemismo.

PALAVRAS-CHAVE: *Siderastrea stellata*. recifes tropicais. doenças em corais. Patógenos. Nordeste brasileiro

ABSTRACT

Coral diseases are known from the 1970s onwards, with the classification of Black Band disease. After the first descriptions, about twenty other diseases were cataloged and described for the most diverse oceans around the world over the next 45 years. However, little is known about the transmission mechanisms and development of these diseases, at what level they reach corals, genetically and cytologically. Thus, this study hoped to answer questions about this development, considering the prevalence and incidence of diseases found in northeastern Brazil, in individuals of the *Siderastrea stellata* stony coral and how they are affected internally and externally. Through monitoring studies, the dominance of two diseases previously registered for the South Atlantic was observed, White Plague disease and the Red Band disease. Both demonstrated a high mortality rate with rates exceeding 40% of individuals killed in the two areas studied. In addition, the diseases were rapidly progressing diseases, evolving an average of 4.5 cm²/month of tissue necrosis. When analyzed at the histological level, the tissues also showed signs of spawning out of season and necrosis in several stages as well as colonies of bacteria and fungi. The presence of epibionts among tissues was also observed, as was the case with cyanobacteria and diatoms. With this work, it is concluded that the monitoring of these diseases must be effective, and protective measures increasingly implemented. Corals that show disease symptoms are only a percentage of everything that is sick. Remediation and mitigation routes should be designed to avoid premature loss of coral reef areas, especially those with a high rate of endemism.

KEYWORDS: *Siderastrea stellate*. tropical reefs. diseases in corals. Pathogens. Northeastern Brazil

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1 – Localização das áreas de estudo no litoral da Paraíba: (a) recifes da praia do Seixas e (b) recifes da praia de Pitimbu..... 24
- Figura 2 – Visibilidade da água dos dois locais de coleta. (a) Pitimbu e (b) Praia do Seixas..... 24
- Figura 3 – Esquema de marcação das colônias para acompanhamento da incidência e prevalência de doenças, realizado em M_0 25
- Figura 4 – Marcações das colônias feitas nas duas áreas de estudo. (a) Pitimbu, (b) e (c) Praia do Seixas..... 26
- Figura 5 – Esquema de delimitação da comunidade adjacente, para censo, nas áreas de estudo..... 27
- Figura 6 – Esquema representativo de como foram medidas as progressões nas doenças linearmente, para posteriormente serem calculadas as progressões reais..... 29
- Figura 7 – Representação gráfica do número de colônias doentes, saudáveis e mortas em M_1 e M_{12} , na Praia do Seixas..... 31
- Figura 8 – Representação gráfica do número de colônias doentes, saudáveis e mortas em M_1 e M_{12} , na Praia de Pitimbu..... 32
- Figura 9 – Colônias de *Siderastrea stellata* mostrando sinais de duas doenças diferentes. (a) colônia com padrões avançados de Praga Branca, (b) colônia com padrão inicial da doença da Banda Vermelha, (c) colônia com padrões avançados de Banda Vermelha..... 33
- Figura 10 – Colônias de *Siderastrea stellata* apresentando (a) Síndrome Branca e (b) Pontos Negros..... 34
- Figura 11 – Métodos utilizado para a marcação das colônias. (a) Método utilizado para marcação das colônias em acompanhamento de prevalência com pregosão diretamente sobre a colônia e (b) método para checagem de progressão da doença da Banda Vermelha..... 34
- Figura 12 – Progressão das duas doenças monitoradas. (a) O prego fixado indica o ponto de marcação no início do acompanhamento da progressão. Mostrando total necrose do tecido de *S. stellata* colonização por alga calcária, (b) mudança de coloração causada pela necrose de tecido em *S. stellata* pela doença da Banda Vermelha..... 35

Capítulo 2

Figura 1 – Fotos das bóias marcadoras do experimento como referência de turbidez da água. (a) Bóia na área onde foram coletados os tecidos dos corais na Praia do Seixas e (b) bóia na área onde foram coletados os tecidos dos corais na Praia de Pitimbu.....	49
Figura 2 – Exemplo esquemático da coleta de tecido. (A1) Área da colônia visualmente saudável, (A2) banda da doença e (A3) área necrosada.....	50
Figura 3 – Tecidos em processo de descalcificação. (a) Tecidos colocado em colução de ácido fórmico e (b) tecido de área de banda (A2) após a descalcificação total do esqueleto.....	51
Figura 4 – Morfologia grosseira do tecido mole após o processo de descalcificação, visualização em microscópio óptico de corpos estranhos entre os tecidos do coral.....	53
Figura 5 – Análise das lâminas quanto a morfologia das três áreas do coral coletado.....	54
Figura 6 – Presença de estruturas secretoras de muco.....	55
Figura 7 – Presença de ovos e larvas plânula entre os tecidos de <i>S. stellata</i>	56
Figura 8 – Presença de corpos estranhos entre os tecidos de corais das variadas amostras.	57
Figura 9 – Lâminas de área de banda da doença (A2) vistas em microscopia óptica com 40x de aumento.....	58
Figura 10 – Lâminas coradas com coloração de GROCOTT com presença de fungos.....	59
Figura 11 – Teste de agrupamento por amostra. Foi dividido em três grupos distintos, mostrando principalmente a diferenciação entre as amostras de tecido doente	59

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1 – Incidência e prevalência do total das doenças nos 12 momentos de coleta em relação à população geral nos recifes do Seixas.....	30
Tabela 2 – Incidência e prevalência do total das doenças nos 12 momentos de coleta em relação à população geral nos recifes de Pitimbu.....	31

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	11
2. OBJETIVOS.....	14
3. PERGUNTAS E HIPÓTESES DO TEMA CENTRAL DA DISSERTAÇÃO	14
4. ESTRUTURA GERAL DA DISSERTAÇÃO.....	15
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	15
CAPÍTULO 1. ASPECTOS ECOLÓGICOS DA INCIDÊNCIA E PREVALÊNCIA DE DOENÇAS SOB A COMUNIDADE DE CORAIS ESCLERACTÍNEOS EM RECIFES TROPICAIS RASOS ...	17
RESUMO	18
ABSTRACT	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS	23
2.1 ÁREAS DE ESTUDO	23
2.2. DESENHO AMOSTRAL	23
2.3 ANÁLISE DOS DADOS	23
3. RESULTADOS	30
4. DISCUSSÃO	36
5. CONCLUSÃO	39
REFERÊNCIAS	39
CAPÍTULO 2. MUDANÇAS À NÍVEL HISTOLÓGICO DAS DOENÇAS PRAGA BRANCA E BANDA VERMELHA, EM TECIDO DO CORAL ENDÊMICO <i>SIDERASTREA STELLATA</i> (CNIDARIA: SCLERACTINIA)	43
ABSTRACT	44
RESUMO	45
INTRODUÇÃO	46
MATERIAL E MÉTODOS.....	48
A. ÁREAS DE ESTUDO	48
B. DESENHO AMOSTRAL.....	49
C. PREPARAÇÃO DO TECIDO	49
D. ANÁLISE DOS DADOS	50
RESULTADOS.....	53
DISCUSSÃO	60
REFERÊNCIAS	63

1. INTRODUÇÃO GERAL

As doenças em corais começaram a ser catalogadas em 1978 e desde então, com o aumento do número de trabalhos realizados com este enfoque, as duas doenças registradas no final dos anos 1970, passaram para mais de vinte e cinco doenças catalogadas e descritas nos 40 anos que seguiram (GARRETT; DUCKLOW, 1975; WOODLEY et al., 2016).

As doenças podem ser desencadeadas por fatores internos ou externos. Dentre os fatores externos, os mais comuns são: a mudança brusca da temperatura e o aumento do pH da água, sobretudo a água superficial do oceano, onde a maior parte dos corais são encontrados. Estes fatores externos são encontrados, porém, influenciando em fatores internos, como a imunidade (ARONSON; PRECHT, 2001; SHORE; CALDWELL, 2019; POLLOCK et al., 2019).

Os corais são animais que, diferente dos mamíferos e da grande maioria dos outros animais, não possuem a capacidade de guardar respostas imunológicas a ataques feitos por agentes externos anteriormente. A falta dessa capacidade está no fato de os corais, apesar de indivíduos complexos e com várias simbioses, não possuem imunidade adaptativa, somente a inata (WOODLEY et al., 2016; POLLOCK et al., 2019).

As doenças em corais são particularmente preocupantes pois os mesmos não possuem a capacidade resiliente a nenhuma doença, diferente do que já pode ser mostrado quando o coral se recupera de um braqueamento. Antes de serem levados a morte, os corais passam por um total desequilíbrio de suas funções principais, como alimentação, reprodução, recrutamento e crescimento. Corais doentes podem demonstrar sinais de que assim estão antes mesmo da perda de tecido, como é o caso de crescimento irregular (i. e. tumores) dos tecidos (MAYNARD et al., 2015; WOODLEY et al., 2016; TRAYLOR-KNOWLES; CONNELLY, 2017).

As doenças em sua maioria, apresentam padrões que vão desde descoloração ou coloração atípica, até a perda de tecido e colonização por algas. As causas das doenças são associadas, sobretudo, ao desequilíbrio do meio em que os corais vivem. O desequilíbrio pode vir através de ações naturais, como no caso de terremotos e tufões, como por fontes externas, como a poluição e o aumento da temperatura da água superficial do oceano, como resultado do aquecimento global (RAYMUNDO et al., 2008; HUGHES et al., 2018).

Quando o desequilíbrio se instaura no meio marinho, por se tratar de um meio sem barreiras e altamente fluído, os corais reagem de diversas formas. Essa reação pode levar a um

branqueamento, a uma doença ou a um branqueamento seguido de doença, como é muito bem relatado pela literatura. As doenças porém, não afetam somente a nível de tecido. Parte das doenças já estudadas, como o caso da Banda Branca, pode afetar o coral a nível celular e molecular. Pouco se sabe ainda da capacidade genética de um coral anteriormente afetado por uma doença (MAYNARD et al., 2015; WOODLEY et al., 2016).

O nível que a doença afeta um coral, está diretamente ligado ao patógeno causador, uma vez que para diferenciar uma dada doença, deve-se ter um patógeno, um hospedeiro e o ambiente em que ambos estão inseridos. Os patógenos de corais podem ser bactérias e fungos. Essas bactérias podem ser parasitas externos ou bactérias que fazem parte da microbiota dos corais que por algum estresse focal, passa a se desenvolver e desempenhar funções descontroladamente (PRECHT et al., 2016; CASTANEDA et al., 2018).

Os patógenos podem ser carregados pelas correntes do mar ou estarem presentes em algas e aparato bucal de diversos animais, como é o caso de moluscos e poliquetas. Dois exemplos dos mais estudados são o branqueamento infeccioso decorrente da coralivoria por parte do poliqueta *Hermodice carunculata* e dos gastrópode do gênero *Drupella*. No caso dos fungos, eles são em sua maioria transmitidos através das corrente marinhas, e podem ser potencialmente usados como indicadores de origem de uma corrente. Estudos atuais, porém, demonstraram não haver mudanças na progressão de doenças como Banda Negra, graças a coralivoria por peixes (TSANG; ANG, 2014; BRIGHT et al., 2016; NICOLET et al., 2018; TSANG; ANG, 2019)

Os parasitas precisam, em sua maioria, de hospedeiros vulneráveis para poderem se alojar e desenvolver-se. Um coral debilitado, torna-se um hospedeiro em foco, uma vez que, por não possuírem sistema imune adaptativo que poderia reagir a entrada de organismos estranhos com maior rapidez e facilidade, tornam-se alvos fáceis. O coral pode ser debilitado por diversos fatores como: branqueamento, choques mecânicos ou diversas outras mudanças bruscas em seu meio (PUTNAM et al., 2017).

Como um todo, pouco ainda sabe-se sobre a maioria das doenças, como o que causa e a que taxa de progressão e a transmissão elas caminham. Grande parte desse desconhecimento da-se pela falta de trabalhos que acompanham as doenças, bem como a lacuna da epidemiologia no que diz respeito a associar uma doença à um ou vários parasitas (WOODLEY et al., 2016).

Apesar de lacunas a serem preenchidas, a literatura mostra que alguns fatores como sombreamento e temperaturas médias anuais menores, podem reduzir a progressão, enquanto

que o aumento de nutrientes na água pode aumentar a progressão das doenças como a doença da Banda Negra (VOSS; RICHARDSON, 2006; RAYMUNDO et al., 2008; MULLER; VAN WOESIK, 2009).

Todos esses podem ser classificados como danos, uma vez que não afetam a nível citológico o tecido do coral. Os danos, apesar de possuírem maiores taxas de resiliência por parte dos corais, podem ser facilitadores de doenças. No caso de danos mecânicos, podem facilitar a entrada de microorganismos no tecido; enquanto que, um dano por sedimentação e despigmentação pode fragilizar o coral em relação a obtenção de alimento. Os danos, por si só, são potencialmente mortais a depender de como se espalham e por quanto tempo se mantêm (POLLOCK et al., 2014).

Os danos podem ainda ser relevantes quando consideramos a incidência e prevalência de doenças em uma população. Isto ocorre, pois os danos podem se espalhar em um coral doente ou fazê-lo piorar. Isso é de grande importância uma vez que impedem uma possível recuperação dos corais. Além disso, os danos podem abrir espaço para a colonização por algas, um dos maiores competidores dos corais por espaço (POLLOCK et al., 2014; PRECHT et al., 2016).

A epidemiologia classifica a incidência das doenças como a forma que novos casos aparecem na população. Dessa forma, nos corais, a incidência é medida pelos novos casos em um determinado espaço de tempo em uma população de acompanhamento. A importância de se estudar a incidência das doenças, deriva do fato de necessitar entender a porcentagem de uma população que pode ser contaminada com aquela doença, em um dado espaço de tempo. Torna-se ainda mais importante, quando a incidência é aliada a estudos de progressão, de forma a detectar precocemente padrões de evolução de uma doença (WOODLEY et al., 2016).

A prevalência é também uma importante medida, pois com seu levantamento é possível aferir qual determinada doença é mais comum em uma população. Dessa forma é possível a comparação entre populações e formas de respostas dos modelos usados para estudá-la. Além disso, a prevalência é uma ferramenta que consegue prever alguns fatores que tornaram a população acompanhada mais susceptível às doenças (FRÉROT et al., 2018).

Nesse sentido, estudos para entender os níveis em que estes animais estão sendo afetados são importantes para delimitar causas e pensar possíveis soluções. Tais possíveis soluções podem ir de manipulações experimentais a modificação genética, casados com soluções ecológicas.

2. OBJETIVOS

a. Objetivo geral

Avaliar a saúde de corais escleractíneos através do monitoramento das taxas de incidência e prevalência e da morfologia a grosso modo e microscópica dos corais estudados contaminados.

b. Objetivos específicos

- Identificar visualmente e caracterizar as doenças registradas nas áreas estudadas;
- Calcular a taxa de incidência e prevalência de doenças em corais nas áreas estudadas;
- Avaliar a diferença nas taxas de incidência e prevalência entre as praias e entres os meses de coleta;
- Analisar a morfologia microscópica e a presença ou ausência de fungos e bactérias simbioses presentes no tecido mole dos animais contaminados.

3. PERGUNTAS E HIPÓTESES DO TEMA CENTRAL DA DISSERTAÇÃO

- Há diferença a nível ecológico e citológico entre as cinco doenças estudadas (Banda Branca, Banda Vermelha, Pontos Negros, Síndrome Branca e Praga Branca) ao que diz respeito suas prevalências e incidências? Essas diferenças também podem ser observadas entre as duas áreas?

- As doenças conhecidas como doenças brancas (e.g., síndrome branca, praga branca e banda branca) apresentam maior taxa de progressão em relação a outras doenças, sendo assim uma das principais características que as colocam nessa classificação. A incidência e prevalência, todavia não diferencia das outras doenças encontradas. Quanto aos locais, a diferença pode ser encontrada graças aos processos que ocorrem em áreas distintas, como correntes, ação humana e distância do recife da praia.

- Há diferença histológica entre a parte do tecido já coberto pela lesão causada pela

doença, borda da doença e parte do coral ainda sadio?

- A parte da banda da doença (i. e. o limite entre a parte anteriormente infectada e a parte ainda sadia do coral) é a parte com o maior número de microrganismos agindo intensamente sobre o tecido do coral que antes era sadio. A parte já necrosada acredita-se apresentar menos microrganismos por sua vez, já que o tecido foi totalmente corroído pela microbiota.

4. ESTRUTURA GERAL DA DISSERTAÇÃO

A versão final da dissertação foi dividida em 2 capítulos. O primeiro aborda os aspectos ecológicos da progressão, incidência e prevalência de doenças em duas áreas recifais no litoral da Paraíba, e a segundo aborda as características à nível histológico causadas por duas diferentes doenças comumente encontradas nestes recifes. Desta forma, os capítulos foram intitulados:

1 - Aspectos ecológicos da incidência, prevalência e progressão de doenças sob a comunidade de corais escleractíneos em recifes tropicais rasos.

2 - Mudanças à nível histológico das doenças Praga Branca e Banda Vermelha, em tecido do coral endêmico *Siderastrea stellata* (Cnidaria: Scleractinia).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARONSON, Richard B.; PRECHT, William F. White-band disease and the changing face of Caribbean coral reefs. **The Ecology and Etiology of Newly Emerging Marine Diseases**, p.25-38, 2001.

BRIGHT, Allan J. et al. Disease Prevalence and Snail Predation Associated with Swell-Generated Damage on the Threatened Coral, *Acropora palmata* (Lamarck). **Frontiers in Marine Science**, v. 3, p.1-13, 2016.

CASTANEDA, Maria et al. Bacteria that affects coral health with an emphasis on the Gulf of Mexico and the Caribbean Sea. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 46, n. 5, p.880-889, 2018

FRÉROT, Mathilde et al. What is epidemiology? Changing definitions of epidemiology 1978-2017. **Plos One**, v. 13, n. 12, p.1-27. 2018.

- GARRETT, Peter; DUCKLOW, Hugh. Coral diseases in Bermuda. **Nature**, v. 253, n. 5490, p.349-350, 1975.
- HUGHES, Terry P. et al. Global warming transforms coral reef assemblages. **Nature**, v. 556, n. 7702, p.492-496, 2018.
- MAYNARD, Jeffrey et al. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. **Nature Climate Change**, v. 5, n. 7, p.688-694, 2015.
- NICOLET, Kj et al. Selective feeding by corallivorous fishes neither promotes nor reduces progression rates of black band disease. **Marine Ecology Progress Series**, v. 594, p.95-106, 2018.
- POLLOCK, F. Joseph et al. Reduced diversity and stability of coral-associated bacterial communities and suppressed immune function precedes disease onset in corals. **Royal Society Open Science**, v. 6, n. 6, p.190355-190371, 2018.
- POLLOCK, F. Joseph et al. Sediment and Turbidity Associated with Offshore Dredging Increase Coral Disease Prevalence on Nearby Reefs. **Plos One**, v. 9, n. 7, p.1-8, 2014.
- PRECHT, William F. et al. Unprecedented Disease-Related Coral Mortality in Southeastern Florida. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-11, 2016.
- PUTNAM, Hollie M. et al. The Vulnerability and Resilience of Reef-Building Corals. **Current Biology**, v. 27, n. 11, p.528-540, 2017.
- SHORE, Amanda; CALDWELL, Jamie M. Modes of coral disease transmission: how do diseases spread between individuals and among populations? **Marine Biology**, v. 166, n. 4, p.1-14, 2019.
- TRAYLOR-KNOWLES, Nikki; CONNELLY, Michael T. What Is Currently Known About the Effects of Climate Change on the Coral Immune Response. **Current Climate Change Reports**, v. 3, n. 4, p.252-260, 2017.
- TSANG, Ryan Ho Leung; ANG, Put. Cold temperature stress and predation effects on corals: their possible roles in structuring a nonreefal coral community. **Coral Reefs**, v. 34, n. 1, p.97-108, 2014.
- TSANG, Ryan Ho Leung; ANG, Put. Resistance to temperature stress and *Drupella* corallivory may promote the dominance of *Platygyra acuta* in the marginal coral communities in Hong Kong. **Marine Environmental Research**, v. 144, p.20-27, 2019.

CAPÍTULO 1

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Diseases of Aquatic Organisms*

Aspectos ecológicos da incidência e prevalência de doenças sob a comunidade de corais escleractíneos em recifes tropicais rasos

Camile Dias Avelino & Thelma Lúcia Pereira Dias

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Biologia Marinha, CCBS, Departamento de Biologia, Rua das Barúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, Brasil.

RESUMO

Os corais são organismos sésseis extremamente vulneráveis a mudanças em seu entorno. A principal mudança observada em ambientes marinhos está relacionada ao aumento da temperatura superficial da água. O branqueamento térmico decorrente de anomalias térmicas ou aumento de temperatura superficial do oceano, é o principal fator relacionado às doenças. A partir de previsões realizadas, acredita-se que os casos de doenças acarretando em morte de corais ultrapassará as mortes por branqueamento em poucas décadas. Nesse contexto, este estudo visou obter dados inéditos no Atlântico Sul, sobre as consequências ecológicas da prevalência e incidência sobre a comunidade de corais escleractíneos em ambientes costeiros rasos, os quais estão mais sujeitos aos eventos de anomalias térmicas regionais e globais. O trabalho foi realizado em duas áreas de recifes costeiros rasos, Praia do Seixa e Praia de Pitimbu, ambas localizadas no estado da Paraíba nos anos de 2018 e 2019. Para a análise da prevalência e incidência, uma amostra de 70 indivíduos da população de *Siderastrea stellata* foi marcada em cada área e ao todo, foram realizadas duas idas mensais ao campo, totalizando doze idas ao longo de seis meses. Os resultados mostraram que a temperatura média nos recifes do Seixas foi de 30,4 °C, com variação de 9 °C. Nos recifes de Pitimbu, a temperatura média foi de 30,6 °C, com variação de 7 °C. Ambas as áreas apresentaram mortalidade de 40% do total da população marcada, com números baixos de incidência e picos de prevalência. O teste de Wilcoxon acusou diferença entre prevalências nas duas praias ($p=0,022857$) mas não houve diferença significativa entre as incidências das duas praias ($p=0,68583$). Este trabalho apresenta o primeiro trabalho experimental de acompanhamento *in situ* para a Paraíba, e o primeiro focado nas incidências e prevalências dessas doenças para a espécie endêmica *S. stellata*. Desta forma, ele é de vital importância para os trabalhos seguintes de forma a relacionar outros aspectos da saúde dos corais com o que é demonstrado nesse estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Corais escleractíneos, *Porites astreoides*, *Siderastrea stellata*

ABSTRACT

Corals are sessile organisms extremely vulnerable to changes in their environments. The main change observed in marine environments is related to the increase of surface water temperature. Thermal bleaching due to thermal anomalies or rising ocean surface temperatures is the main disease-related factor. From predictions made, it is believed that cases of diseases leading to coral death will exceed bleach deaths in a few decades. In this context, this study aimed to obtain unpublished data in the South Atlantic about the ecological consequences of the prevalence and incidence on the scleractinian coral community in shallow coastal environments, which are more subject to regional and global thermal anomaly events. The work was carried out in two shallow coastal Reefs, Praia do Seixas and Praia de Pitimbu, both located in the state of Paraíba and the study was carried in 2018 and 2019. For the analysis of prevalence and incidence, a sample of 70 individuals of the hard coral *Siderastrea stellata* was marked in each area and in total, two monthly field trips were made, totaling twelve trips over six months. The results showed that the average temperature in Seixas reefs was 30.4 °C, with a variation of 9 °C. In the Pitimbu reefs, the average temperature was 30.6 °C, with a variation of 7 °C. Both areas had a mortality rate of 40% of the total population marked, with low incidence numbers and prevalence peaks. The Wilcoxon test showed a difference between prevalence on both beaches ($p = 0.022857$) but there was no significant difference between the incidences of both beaches ($p = 0.68583$). This paper presents the first experimental in situ follow-up work for Paraíba, and the first focused on the incidence and prevalence of these diseases for the endemic species *S. stellata*. Thus, it is vitally important for further work in order to relate other aspects of coral health to what is shown in this study.

KEYWORDS: Hard corals, *Porites astreoides*, *Siderastrea stellata*

1. INTRODUÇÃO

Os corais são organismos sésseis extremamente vulneráveis a mudanças em seu entorno. A principal mudança observada em ambientes marinhos está relacionada ao aumento da temperatura superficial da água, afetando principalmente animais de áreas rasas e que sofrem exposição na maré baixa. O principal efeito negativo decorrente desse aumento da temperatura é o branqueamento dos corais por aquecimento. O branqueamento ocorre quando as células dos corais expulsam todas ou, quase todas, as microalgas simbiotes (chamadas zooxantelas) que vivem nas células dos corais e são as responsáveis por gerar a maior parte da fonte de alimento de um coral, através da fotossíntese (LOUGH & VAN OPPEN, 2018).

O branqueamento é conhecido por se desencadear graças a uma série de estresses externos, como a salinidade, pH e poluição, mas é o calor que define grande parte de como esses fatores operam sobre a comunidade de coral. Em meados dos anos 1980 até 2000, os casos de branqueamento eram em menor escala e desencadeados por fatores estressantes focais (GLYNN, 1983; HOEGH-GULDBERG, 1999). Atualmente com o subsequente aquecimento global impulsionado por atividades antropogênicas, a escala de ambientes afetados é muito maior e os efeitos muito mais desastrosos. Os principais eventos de branqueamento ocorreram em escala global nos anos de 1998, 2010 e novamente em 2017. Destes, somente o de 2017 não foi observado na costa do Brasil (CASTRO & PIRES, 1999; LEÃO et al., 2016; LOUGH & VAN OPPEN, 2018).

Libro e Vollmer (2016) e Ziegler et al. (2017), demonstraram através de experimentos *in situ* e em mesocosmos que, há diferença no que eles dividem entre corais termo-tolerantes e termo-sensíveis, quanto a sua resistência à proliferação de microrganismos já presentes na microbiota normal do coral. Corais termo-tolerantes possuem estratégias internas que garantem a manutenção das funções básicas do coral, dentre estas, garantem que os microrganismos associados não se desenvolvam de forma descontrolada. Já nos termo-sensíveis essa proteção não é garantida após um aquecimento brusco.

A maior parte das doenças surge por fatores externos atuando diretamente nos corais, como é o caso do aumento das temperaturas. O branqueamento térmico decorrente de anomalias térmicas ou aumento de temperatura superficial do oceano, é o principal fator relacionado às doenças (BOURNE et al., 2016; WEBSTER & REUSCH, 2017). A partir de previsões realizadas, acredita-se que os casos de doenças acarretando em morte de corais ultrapassará as mortes por branqueamento em poucas décadas (MAYNARD et al., 2015).

São consideradas doenças, eventos não aleatórios que possuem três pilares principais: o hospedeiro, o patógeno e ambiente em que o hospedeiro está inserido. Todavia, para as doenças em ambientes marinhos, as definições de que uma específica doença seja causada por um específico patógeno não é tão simples como em ambientes terrestres (WOODLEY et al., 2016).

Entre o ano de 1973, com o primeiro registro da doença da Banda Negra em corais no mar do Caribe, e o ano de 1998, foram registradas 12 diferentes doenças ao redor do mundo (HAYES & GOREAU, 1998). Hoje, ao todo são registradas 25 doenças atingindo corais, octocorais e hidróides calcários, número que tende a aumentar com o aumento dos estudos. Os oceanos com o maior número de registros de doenças são o Oceano Índico e o Oceano Pacífico (WOODLEY et al., 2016).

Dentre as doenças registradas, as ditas “doenças brancas”, dentre elas a Banda Branca e a Praga Branca, são as mais bem estudadas e com altas taxas de progressão, principalmente em áreas rasas (RAYMUNDO et al., 2008; RANDALL & VAN WOESIK, 2015; WOODLEY et al., 2016; RANDALL & VAN WOESIK, 2017).

As doenças recebem essa diferenciação imposta após anos de discussão. Devido aos poucos estudos, anteriormente se consideravam todas as doenças brancas como sendo uma só e com um único patógeno causador e desconhecido. Todas eram denominadas como síndrome branca. Hoje, as doenças brancas são bem definidas, porém seus patógenos ainda não são bem conhecidos, e a Síndrome Branca é uma doença branca também. Os primeiros registros de doenças brancas se referem a doença da Banda Branca e datam de 1981 (ANTONIUS, 1985; WOODLEY et al., 2016).

O organismo dos corais conta com uma série de defesas imunológicas como amebócitos, depósitos de melanina e químicos antibióticos. Essas defesas agem diretamente no epitélio do coral, fazendo com que ele seja o órgão mais afetado no caso de uma resposta do sistema imunológico. Esses danos ficam evidentes em testes histológicos e moleculares em que o tecido conjuntivo do coral é quase totalmente destruído (RAYMUNDO et al., 2008; REED; MULLER; VAN WOESIK, 2010; FUESS et al., 2018).

Até recentemente, pouco se sabia sobre as doenças, formas de transmissão, suas causas e a que taxas progrediam. Isso vem mudando principalmente nos últimos 30 anos.

Esse pouco espaço de tempo pode ser explicado por se tratar de algo que é longe da

realidade, enquanto doenças que acometem humanos e doenças veterinárias são melhor estudadas (WOODLEY et al., 2016). Sabe-se, porém, que tanto doenças como eventos de branqueamento em massa têm acarretado perda de biodiversidade, muitas vezes, atingindo espécies endêmicas de corais construtores, a exemplo de *Siderastrea stellata* e *Mussismilia braziliensis*, esta última endêmica do litoral sul da Bahia (FRANCINI- FILHO et al., 2010). O que se pensa como uma alternativa em um mundo ideal, seria minimizar as fontes externas de estresse a fim de aumentar a resiliência do ecossistema recifal como um todo (HUGHES et al., 2017).

O Brasil foi uma das áreas afetadas pelo evento de branqueamento em massa ocorrido em 2010 (MIRANDA et al., 2013; DIAS & GONDIM, 2016). Após o branqueamento ocorrido na costa da Paraíba, respostas como mudanças na pigmentação normal dos corais foram observadas, bem como o surgimento de estágios iniciais de doenças em colônias com diferentes estados de conservação (e.g., branqueadas, com partes aparentemente saudias, entre outras).

A incidência, prevalência e a progressão das doenças difere entre os oceanos. Estudos mostraram que as mesmas doenças podem ser desenvolvidas por patógenos diferentes, em regiões diferentes. Isso também ocasiona diferentes taxas de progressão (GALLOWAY, BRUCKNER, WOODLEY, 2009). A incidência se refere aos novos casos de doença em um dado tempo em uma população, enquanto a prevalência é o número de casos de uma determinada doença dentro da mesma população em relação a outras. Ainda pouco se sabe sobre os fatores que regem incidências e prevalências das doenças em uma população, mas acredita-se que a temperatura é o fator determinante, bem como o patógeno causador. Uma doença de rápida progressão, não necessariamente se trata de uma com alta taxa de incidência e prevalência, uma vez que essas estão relacionadas aos tipos de transmissão e a forma de infecção (RAYMUNDO et al., 2008; WOODLEY et al., 2016).

Há necessidade urgente de se estudar como as doenças afetam corais em diferentes locais e de diferentes espécies, e seus agentes causadores, a fim de entender como a transmissão ocorre e como pode ser evitada. Nesse contexto, este estudo visou obter dados inéditos no Atlântico Sul, sobre as taxas de incidência e prevalência de doenças sobre a comunidade de corais escleractíneos em ambientes costeiros rasos, os quais estão mais sujeitos aos eventos de anomalias térmicas regionais e globais.

Os dados do estudo são de suma importância para o uso em gestão ambiental das áreas costeiras e marinhas, podendo ser usados como ferramenta para tomada de decisão política e

administrativa em ações para conservação, ou mesmo reavaliação de áreas já existentes que apresentem fisionomia como as do estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas formações recifais costeiras situadas no litoral da Paraíba, a saber: recifes da Praia do Seixas e recifes da Praia de Pitimbu, ambas submetidas ao turismo (**Fig. 1**).

2.1.1 Recifes da Praia do Seixas

A Praia do Seixas ($7^{\circ}09'21''\text{S}$, $34^{\circ}47'10''\text{W}$) é caracterizada por formações recifais aparentes na maré baixa há cerca de 500 m da praia apresentando áreas com profundidade de poucos centímetros na maré baixa. Suas formações recifais servem como habitat, refúgio e alimento para muitos animais como espécies de peixes e invertebrados. Por se tratar de uma formação muito próxima à praia, esses corais sofrem intensa influência de quebra de onda, que diminui a visibilidade da água principalmente nos meses do inverno, e o aumento na temperatura da água (DIAS & GONDIM, 2016). A formação recifal ocupa uma área de cerca de 1km^2 em que toda essa área apresenta diferentes características subaquáticas.

Por se tratar de uma área inserida no litoral central de João Pessoa, capital do estado, ela está sujeita a forte ação do turismo, com muitos *caiaqueiros*, atividade pesqueira costeira e barcos de visitação turística que ancoram nas áreas das piscinas e chamam atenção dos turistas pelas águas cristalinas no verão (**Fig. 1**).

A Praia do Seixas está entre as áreas atingidas pelo evento de branqueamento em massa que ocorreu em 2010. Na época foram registrados corais e octocorais com suas estruturas físicas completamente branqueadas em decorrência do aumento da temperatura na água superficial (DIAS & GONDIM, 2016). Atualmente, esta área localiza-se nos limites da Área de Proteção Ambiental Naufrágio do Queimado, unidade de conservação estadual criada no final de 2018.

2.1.2 Praia de Pitimbu

A Praia de Pitimbu ($7^{\circ}28'16''\text{S}$, $34^{\circ}48'15''\text{W}$) está localizada há 57 km da capital do estado, João Pessoa, situada ao sul do estado da Paraíba, no município de Pitimbu, quase

fazendo divisa com o litoral pernambucano. Seus recifes possuem características semelhantes aos outros dois locais de estudo, com formações recifais que distam entre 0,6 e 1,5 km da praia. A profundidade dos recifes varia de poucos centímetros a 6 m, na maré baixa.

A fauna é composta por invertebrados que realizam bioerosão, como a presença do ouriço-preto (*Echinometra lucunter*), peixes, corais pétreos e uma grande abundância de hidróides calcários da espécie *Millepora alcicornis*. A área segue o mesmo regime de maré dos outros dois locais de estudo, com água turva nos meses de inverno e com melhor visibilidade nos meses de outubro a abril (**Fig. 2**).

Apesar da formação recifal se assemelhar com as outras e com as formações recifais ao longo da costa do Nordeste, a praia de Pitimbu é pouco estudada. Tem-se poucas informações sobre levantamentos de fauna marinha e de seus usos. Um dos grandes fatores que acarreta isso, é a distância da praia da capital do estado e o tempo de deslocamento até ela, fazendo com que a área seja mais frequentemente usada pela população local através da pesca costeira e o número de turistas ainda é inferior ao observado em áreas recifais mais próximas a capital.

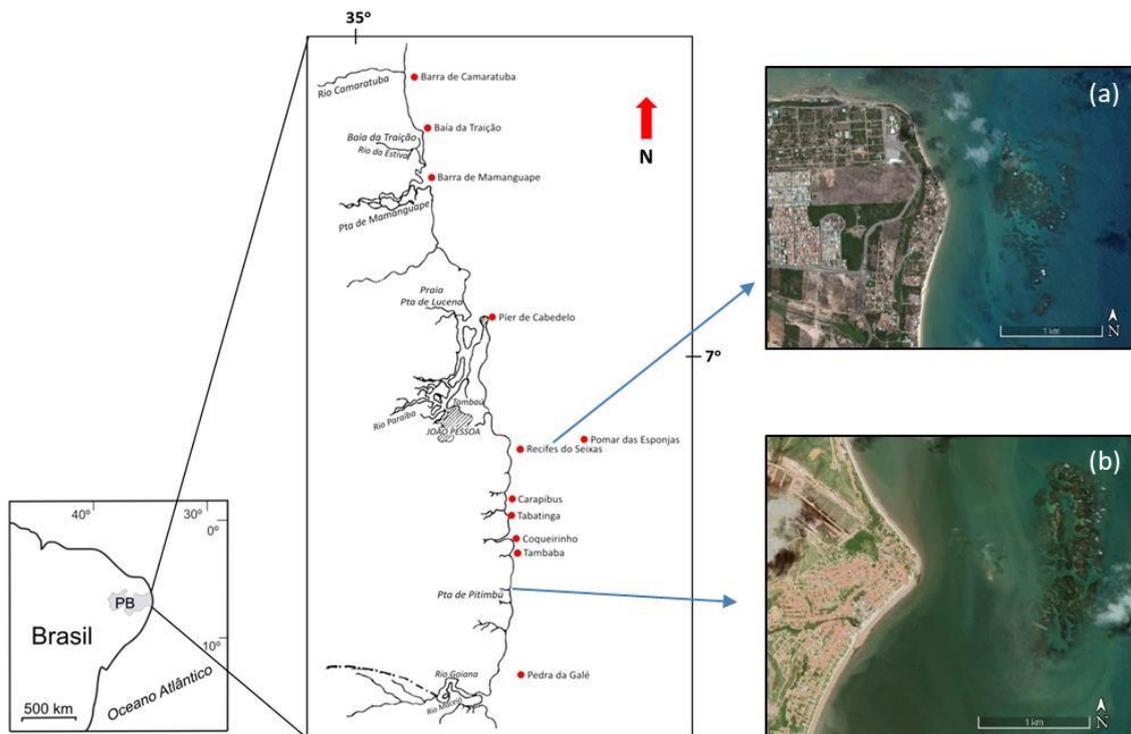


Figura 1. Localização das áreas de estudo no litoral da Paraíba: (a) recifes da praia do Seixas e (b) recifes da praia de Pitimbu. Fonte: Google Earth®.

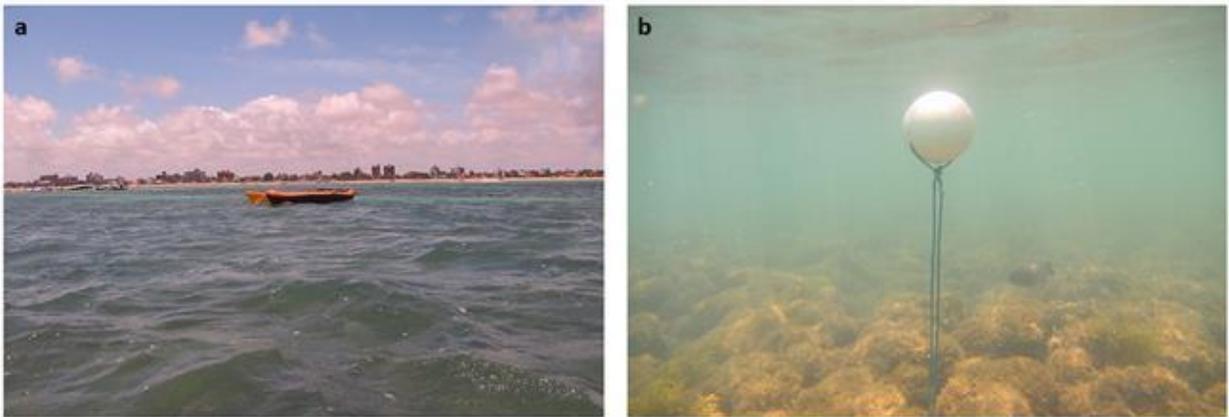


Figura 2. Visibilidade da água dos dois locais de coleta. (a) Pitimbu e (b) Praia do Seixas. Fotos: Camile Avelino.

2.2. Desenho amostral

2.1.1 Trabalho de campo

O estudo foi realizado através de mergulho livre (*snorkeling*) nos meses de outubro de 2018 a maio de 2019 com duas coletas mensais nos meses do verão de 2018/2019. Para a análise da prevalência e incidência, uma amostra de 70 indivíduos da população de *Siderastrea stellata* foi marcada, com o auxílio de pregos e etiquetas plásticas, e delimitada em cada uma das áreas de estudo (**Fig. 3**). Essa espécie foi escolhida por ser endêmica da costa brasileira, por estar amplamente distribuída ao longo do litoral e por figurar como uma das espécies de corais mais resistentes da fauna brasileira, ocorrendo desde a zona entremarés até zonas mesofóticas. A cada mês, na última maré do mês foi feita a checagem da área vizinha, que consistiu de uma área de 3 metros de raio da população para levantamento do número de colônias doentes e suas espécies.

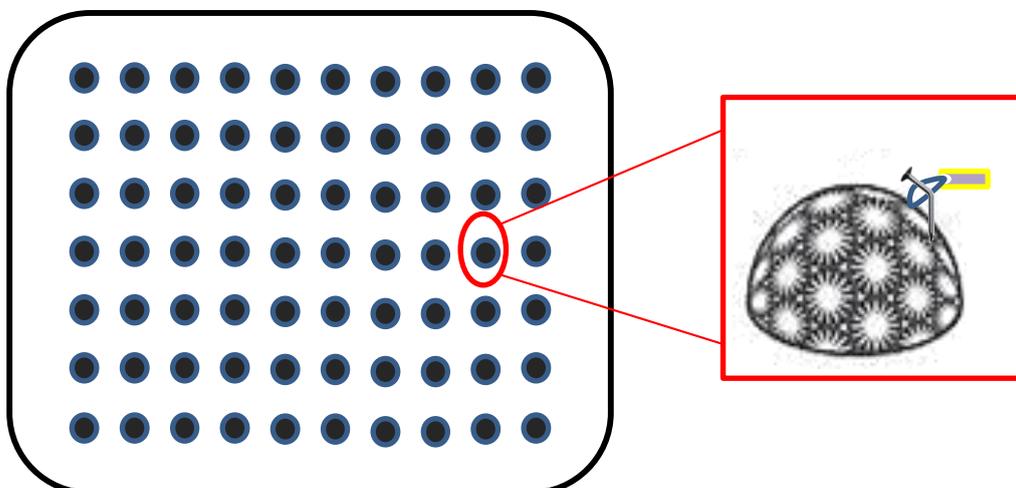


Figura 3. Esquema de marcação das colônias para acompanhamento da incidência e prevalência de doenças, realizado em M_0 .

Para avaliar a incidência e prevalência, foram feitas 13 idas a campo em cada local de estudo. Essas idas foram chamadas de momentos (M), onde o momento inicial (M_0) foi o momento de marcação das colônias e o M_{12} a última investida em campo. Ambas populações foram marcadas em locais com substrato semelhantes entre os locais de estudo, predominantemente coberto por alga e rocha (**Fig. 4**). A área de comunidade adjacente foi demarcada a partir de um raio de 3m da área central das colônias demarcadas (entre C35 e C36), em cada praia (**Fig. 5**).

Durante o período de estudo, realizado majoritariamente no verão, a temperatura média nos recifes do Seixas foi de 30,4 °C, com mínima de 25 °C e máxima de 34 °C (variação de 9 °C). Nos recifes de Pitimbu, a temperatura média foi de 30,6 °C, com mínima de 27 °C e máxima de 34 °C (variação de 7 °C).

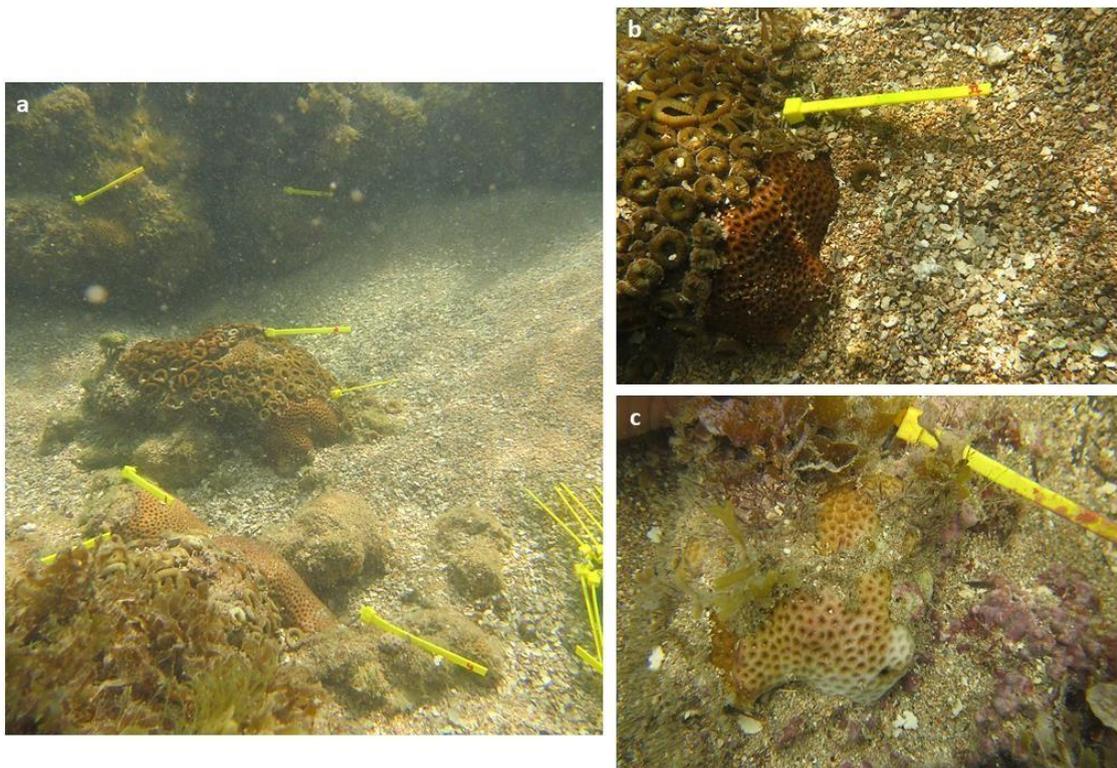


Figura 4. Marcações das colônias feitas nas duas áreas de estudo. Todas as colônias foram marcadas em áreas semelhantes, com maior número de áreas de cascalho e areia do que algas. (a) Pitimbu, (b) e (c) Praia do Seixas. Fotos: Camile Avelino.

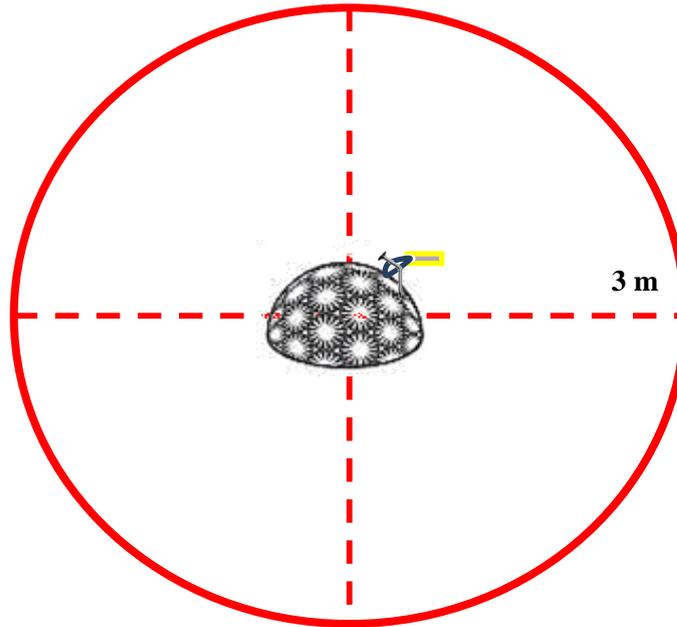


Figura 5. Esquema de delimitação da comunidade adjacente, para censo, nas áreas de estudo.

2.2.2 Análise dos dados

Os dados foram inicialmente organizados em planilhas Excel. A análise dos dados para incidência e prevalência de doenças seguiram o protocolo descrito por RAYMUNDO et al. (2008) utilizando dados de casos antigos e novos casos, como descritos nas fórmulas:

$$\text{Prevalência} = \frac{\text{Total de casos em } Mx}{\text{Total de indivíduos vivos da população}}$$

$$\text{Incidência} = \frac{\text{Novos casos em } Mx}{\text{Total de indivíduos vivos da população}}$$

Para avaliar a diferença na taxa de incidência e prevalência entre as praias, foram aplicados os testes de Bartlett para testar a homogeneidade dos dados e Shapiro-Wilk para a normalidade dos dados e posteriormente o teste T com $p < 0,05$ para testar se há diferença entre as praias. Para avaliar se os fatores abióticos de salinidade, temperatura influenciaram a prevalência de doenças, foi aplicado o teste de correlação de Pearson.

Para calcular a taxa de progressão a fórmula foi feita com base na geometria tradicional para semi-esfera, considerando:

$$A = 2\pi r^2$$

Onde: (A) é a área da semi-esfera, (r) o raio da semi-esfera considerando o mesmo valor da altura medida da base no substrato até o ápice do coral.

Para calcular a área de tecido perdida por mês, foram usadas as fórmulas de fuso esférico, note que, todos os cálculos foram realizados considerando os valores de semi-esfera. Para a área de perda de tecido a fórmula seguinte foi aplicada:

$$Af = \frac{\pi r^2 \alpha}{45}$$

Onde: (Af) é a área do fuso esférico referente à área de tecido perdido a ser calculado, (r) é o valor do raio anteriormente encontrado e (α) o valor em graus da área perdida.

Em relação a progressão das doenças observadas no monitoramento, a taxa de progressão foi medida considerando o mês de coleta e a área de tecido necrosado ($\text{cm}^2/\text{mês}$). O tecido foi considerado como uma medida linear, já que a área exposta e mais globosa do coral é referente ao esqueleto calcário, este, foi descartado no cálculo para área necrosa já que nenhuma das duas doenças são conhecidas na literatura por causar desgaste no esqueleto calcário e nenhum sinal, deste desgaste, foi também observado em campo.

O valor de α foi calculado a partir do tamanho de área medida linearmente como mostra a **Figura 6** e transformado em graus a partir de uma regra de 3 simples da seguinte forma:

$$\frac{180}{x} \frac{\text{Perímetro total do coral}}{\text{Perímetro da área de tecido perdida}}$$

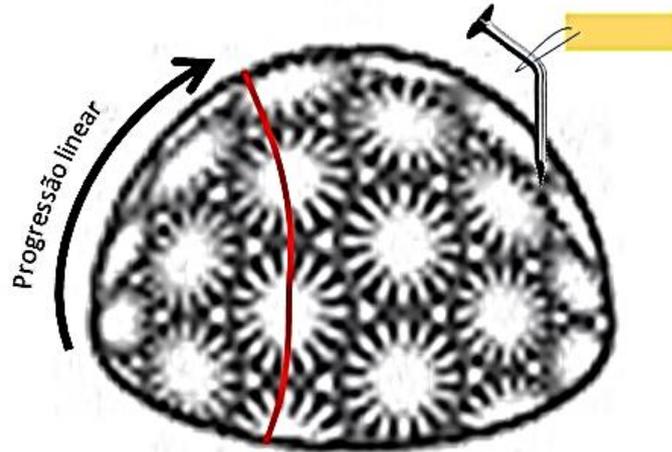


Figura 6. Esquema representativo de como foram medidas as progressões nas doenças linearmente, para posteriormente serem calculadas as progressões reais. Esquema: Camile Avelino.

O resultado da perda de tecido, utilizando-se as fórmulas dadas anteriormente, é dado em $\text{cm}^2/\text{mês}$.

3. RESULTADOS

Das colônias observadas no Seixas, 97,4% (n=113), foram representadas por indivíduos de *Siderastrea stellata*, sendo 11,5% (n=13) de recrutas. Além dela, foram registrados 2 indivíduos de *Porites astreoides* e 1 indivíduo de *Favia gravida*. Em Pitimbu, 95,1% (n=98), foi representado por indivíduos de *Siderastrea stellata*, sendo 14,2% (n=13) de recrutas, além de 5 indivíduos de *Porites astreoides*.

Nas duas praias as coletas foram realizadas em marés entre 0,0 e 0,4, com profundidade média de 1,02 m em Pitimbu e 1,36 m no Seixas. Quanto a salinidade, no Seixas a salinidade teve como média 39%, e máxima de 44% e mínima de 26% (variação de 18%). Em Pitimbu, a média foi de 42,3% com máxima de 47% e mínima de 39% (variação de 8%). Com o acompanhamento da incidência e prevalência, os resultados para as duas praias estão expressos nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1 – Incidência e prevalência do total das doenças nos 12 momentos de coleta em relação à população geral nos recifes do Seixas.

Momento	População (n)	Incidência (%)	Prevalência (%)
S0	70	0	0
S1	66	0.0606	0.0606
S2	66	0.0151	0.0757
S3	66	0	0.0757
S4	66	0.0909	0.1666
S5	66	0	0.1666
S6	59	0	0.0677
S7	59	0	0.0677
S8	57	0	0.0526
S9	56	0	0.0535
S10	49	0	0.0408
S11	45	0	0.0222
S12	42	0	0.0238

Tabela 2 – Incidência e prevalência do total das doenças nos 12 momentos de coleta em relação à população geral nos recifes de Pitimbu.

Momento	População (n)	Incidência (%)	Prevalência (%)
P0	70	0	0
P1	69	0.0579	0.0579
P2	69	0	0.0579
P3	68	0.0147	0.0735
P4	64	0	0.781
P5	64	0.0781	0.1562
P6	61	0	0.1311
P7	61	0	0.1311
P8	59	0	0.1016
P9	54	0	0.1111
P10	43	0	0.0697
P11	41	0	0.0731
P12	38	0	0.0526

Para as duas praias, a prevalência mantém um aumento constante com picos no meio do verão (i.e., P4, P5, S4 e S5), e decai nos momentos de coletas seguintes. O teste de Wilcoxon acusou haver diferença entre prevalências nas duas praias ($p=0,0228$) mas não houve diferença significativa entre as incidências das duas praias ($p=0,6858$). Ao todo, no Seixas, a população final contava com apenas 42 indivíduos de *Siderastrea stellata*, sendo assim, um total de 28 (40%) colônias mortas ao longo do monitoramento. Nos recifes de Pitimbu, o número de colônias ao final foi de 38 colônias, tendo assim, um total de 32 (41,7%) colônias mortas ao longo do monitoramento (**Fig. 7 e 8**).

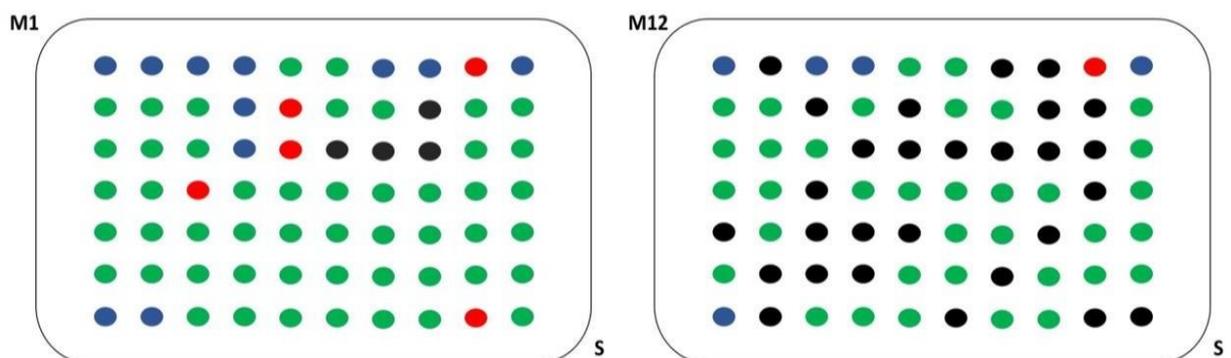


Figura 7. Representação gráfica do número de colônias doentes, saudáveis e mortas em M1 e M12, na Praia do Seixas. Observe que, as colônias saudáveis são aquelas representadas pela cor verde, as doentes pela cor vermelha, com danos em azul e as mortas representadas pelos círculos de cor preta.

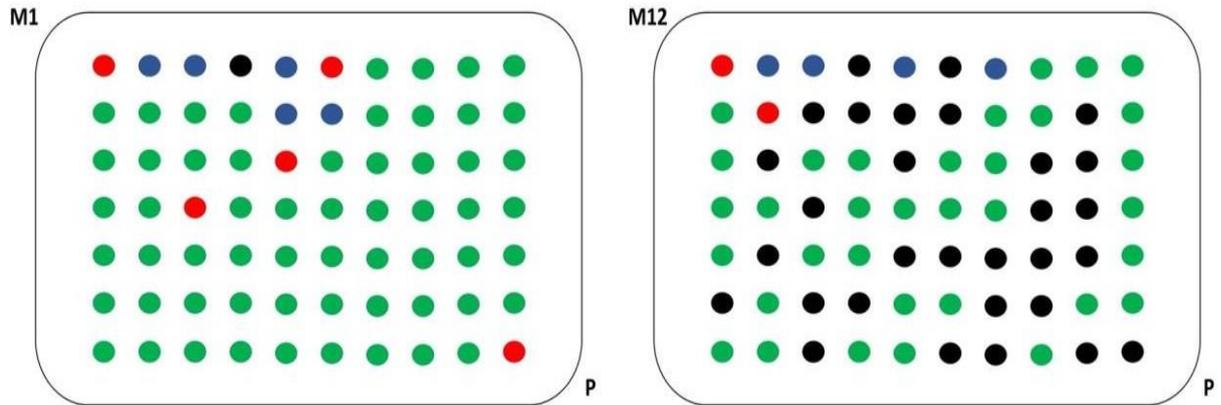


Figura 8. Representação gráfica do número de colônias doentes, saudáveis e mortas em M1 e M12, na Praia de Pitimbu. Observe que, as colônias saudáveis são aquelas representadas pela cor verde, as doentes pela cor vermelha, com danos em azul e as mortas representadas pelos círculos de cor preta.

Apesar dos aumentos observados na prevalência nas duas praias em momentos registrados como pico de temperatura, não houve correlação entre a temperatura e a prevalência nas duas áreas no Seixas ($p=0,7114$) e em Pitimbu ($p=0,1488$).

As doenças mais encontradas nas duas praias foram: Banda Vermelha e Praga Branca. Das 140 colônias marcadas 12 foram de Banda Vermelha e 28 foram de Praga Branca. Do total de 219 colônias nas áreas adjacentes, em 49,7% (n=109) foram encontradas com uma das duas doenças, sendo encontradas somente em *S. stellata* (**Fig. 9**).

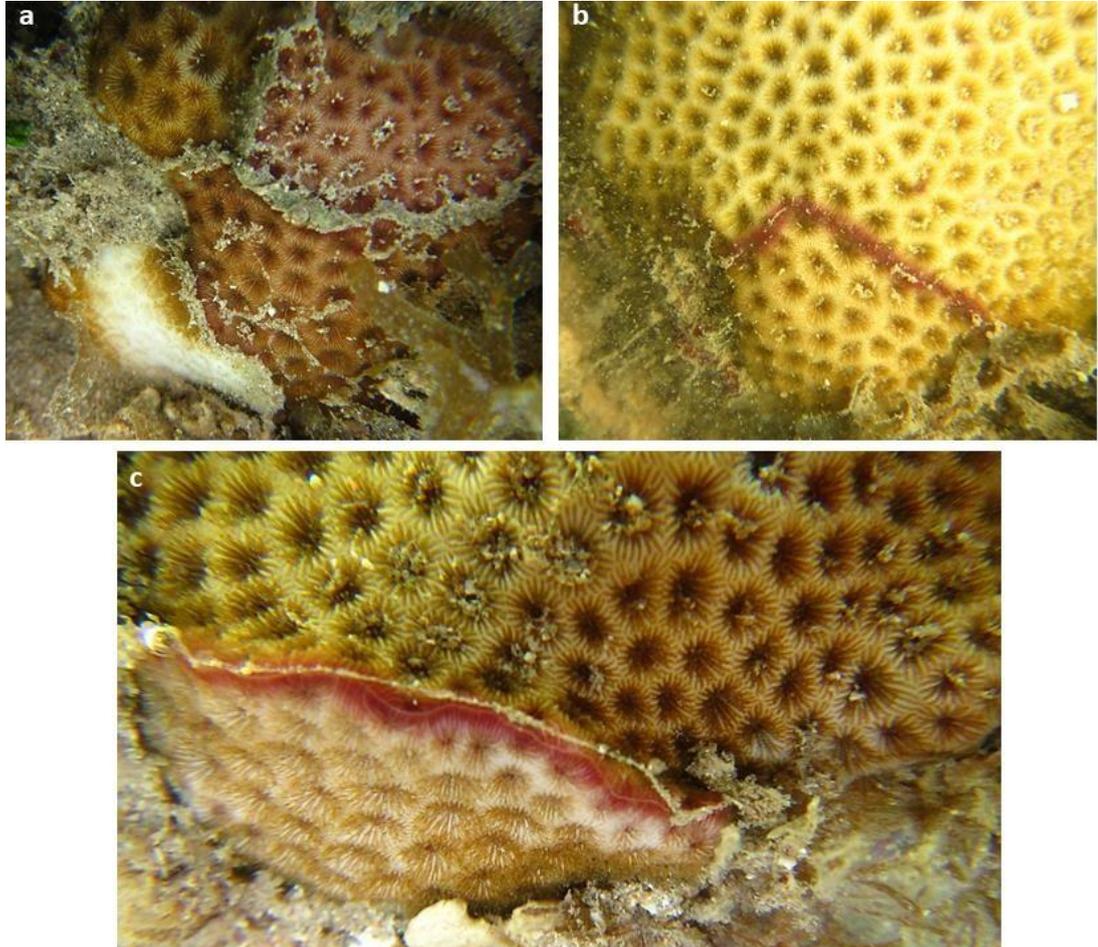


Figura 9. Colônias de *Siderastrea stellata* mostrando sinais de duas doenças diferentes. (a) colônia com padrões avançados de Praga Branca, (b) colônia com padrão inicial da doença da Banda Vermelha, (c) colônia com padrões avançados de Banda Vermelha. Fotos: Camile Avelino.

A doença que mais matou colônias foi a doença da Praga Branca, com um total de 15 colônias mortas no Seixas e 13 mortas em Pitimbu, ao longo do acompanhamento. Outras doenças como a Síndrome Branca e Pontos Negros foram também observadas nas colônias e as mortes causadas por eles estão expressos na **Figura 10**.

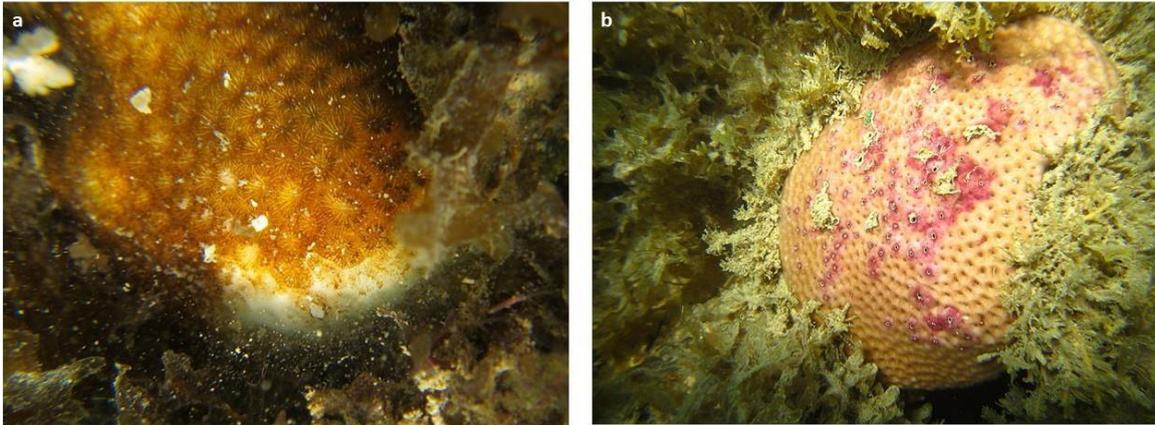


Figura 10. Colônias de *Siderastrea stellata* apresentando (a) Síndrome Branca e (b) Pontos Negros. Fotos: Camile Avelino.

Em relação as diferenças nas taxas de progressão das doenças, a doença que demonstrou maior progressão foi a doença da Banda Vermelha. Esta apresentou média de 5,6 cm/mês para os corais monitorados na Praia do Seixas, e de, 5,4 cm/mês na praia de Pitimbu nos corais monitorados quando comparados o M_0 ao M_{12} (**Fig. 11**).

Para as colônias monitoradas que apresentaram sinais da Praga Branca as taxas de progressão foram de 2,3 cm/mês na Praia do Seixas e de 2,0 cm/mês na praia de Pitimbu nos corais monitorados quando comparados em M_0 e M_{12} (**Fig. 12a**).

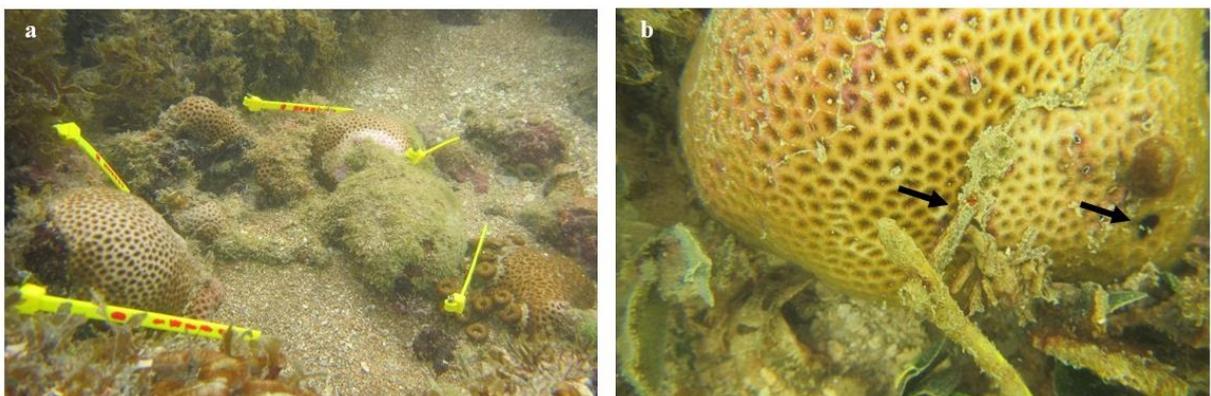


Figura 11. Métodos utilizado para a marcação das colônias. (a) Método utilizado para marcação das colônias em acompanhamento de prevalência com pregos diretamente sobre a colônia, (b) método para checagem de progressão da doença da Banda Vermelha, onde, o prego foi colocado sobre a banda e mudado a cada mês de coleta. As setas pretas indicam o buraco deixado onde estava anteriormente o prego e a progressão de banda com a nova marcação em um mês. Fotos: Camile Avelino.

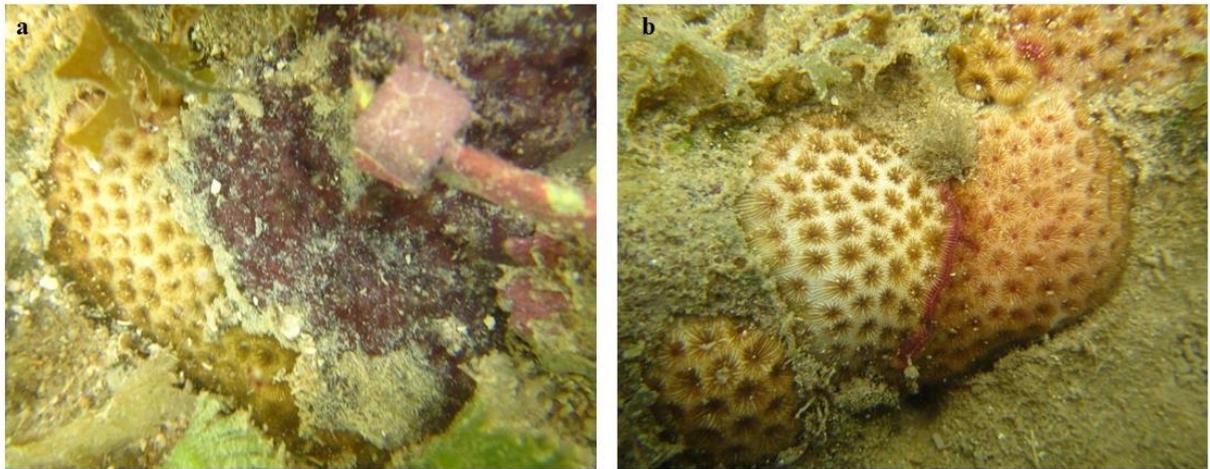


Figura 12. Progressão das duas doenças monitoradas. (a) O prego fixado indica o ponto de marcação no início do acompanhamento da progressão. Mostrando total necrose do tecido de *S. stellata* colonização por alga calcária, (b) mudança de coloração causada pela necrose de tecido em *S. stellata* pela doença da Banda Vermelha. Fotos: Camile Avelino.

4. DISCUSSÃO

Enquanto muitos estudos são feitos afim de determinar a porcentagem momentânea de doenças sobre um recife, o presente estudo abordou e demonstrou a importância de se estudar tanto a dominância por diferentes doenças sobre um mesmo recife, bem como a progressão das doenças mais comum numa abordagem de monitoramento espaço temporal.

A temperatura média de 30°C no verão encontrada para as áreas situadas no nordeste, foi anteriormente reportada mesmo em anos sem anomalia térmica (LEÃO; KIKUCHI; TESTA, 2003). Todavia, as variações mostraram-se maiores do que as registradas para a área do Seixas na mesma época do ano entre os meses de 2015 e 2016 (AVELINO, 2017). Foi observado para outras partes do mundo com comunidades bem formadas de corais, que as variações altas de temperatura, assim como correntes quentes, podem ser responsáveis pela alta mortalidade de corais, afetando diretamente a estrutura do esqueleto e levando a formação de microfilme bacteriano (LEGGAT et al., 2019).

As variáveis do estudo em relação ao substrato foram eliminadas com a escolha de áreas semelhantes, de forma a evitar resultados diferentes, uma vez que sabe-se que o contato com algas pode estar relacionado com a transmissão de doenças (SMITH et al., 2006). Ainda assim, mesmo a população marcada em substrato predominantemente de cascalho, a porcentagem de colônias doentes foi alta e similares entre as áreas, ao longo da realização do estudo, demonstrando que a transmissão pode ser feita através de proximidade entre as colônias e pela debilitação dos corais, como sugerem trabalhos realizados com a espécie *Acropora palmata* (WILLIAMS; MILLER, 2005).

Os indivíduos das áreas adjacentes foram estudados para se manter o controle sobre a população marcada. Dessa forma, a população marcada demonstrou uma parcela do que se pode ver ao longo das duas áreas, quanto a predominância de corais da espécie *Siderastrea stellata* e a alta prevalência da doença da Praga Branca sobre as colônias. Indivíduos de *S. stellata* são bem conhecidos por formar a maior parte dos recifes do Brasil, e principalmente do Nordeste (CASTRO; PIRES, 2001).

A espécie está na lista vermelha da IUCN marcada como Deficiente de Dados, com última revisão tendo sido feita em 2008, e por se tratar de uma espécie endêmica do Brasil, intensificam a necessidade de estudá-las para reconhecer os papéis que a conservação dessa espécie pode significar para o meio marinho na área do endemismo.

Além da presença de *S. stellata*, as outras espécies relatadas, também já são catalogadas pela literatura (LABOREL, 1969). Essas mesmas espécies, principalmente o *Porites astreoides* já é descrita pela literatura como um hospedeiro de doenças como a Praga Branca (RAYMUNDO et al., 2008; WOODLEY et al., 2016). Este fato deve ser levado como alerta para a observação de diferentes hospedeiros para a mesma doença, e como diferentes espécies reagem às doenças.

A salinidade encontrada de aproximadamente 40‰ para as áreas se encaixa para áreas de recife rasos como os das duas áreas. A salinidade não foi testada em relação a prevalência e incidência para as áreas. Todavia, Haapkylä et al. (2011) relatam que mesmo que a salinidade não tenha efeito direto no número de doenças encontradas em corais, em temporadas chuvosas, os foi maior o número de indivíduos doentes. Dessa forma, o representado nesse trabalho, foi somente os meses considerados de menor número de chuvas e uma maior evaporação.

Isto pode suscitar o fato de que após a época de chuvas, os valores para incidência, prevalência e mortalidade dos corais, poderiam ser ainda maiores se a dinâmica assemelhasse a estudada em Haapkylä et al. (2011).

Quanto as temperaturas, apesar do teste de correlação não dar significativo, atribui-se a temperatura como um dos principais fatores à sensibilização das colônias e abertura para microorganismos, bem como a perda de pigmentação e o eventual branqueamento da colônia. A sensibilidade das doenças e a alta taxa de mortalidade pode estar associada aos eventos de branqueamento de anos atrás (JONES et al., 2004; TOUT et al., 2015; WOODLEY et al., 2016).

A incidência zerada na maior parte dos momentos de amostragem, revelam a rápida mortalidade das colônias pelas doenças, principalmente as mais comuns dentro da população (i.e. Praga Branca e Banda Vermelha). Doenças como a doença da Banda Negra já são conhecidas por terem a prevalência alta em áreas em que se instalam. Além disso, a mesma ainda foi observada com picos de incidência em fases de transição entre o período seco e o chuvoso. É provável que as duas doenças mais comumente encontradas sigam parte desse padrão (JOHAN et al., 2016).

A incidência também mostra que as doenças podem matar mais rápido do que se espalhar, mostrando que os autores ainda precisam preencher diversas lacunas no que diz respeito principalmente a incidência (PRECHT et al., 2016). Essa taxa de incidência também está relacionada ao ambiente em que o coral está inserido, no caso do presente estudo, em

recifes costeiro, enquanto que outros estudos demonstram taxas diferentes de incidência e mortalidade, ainda maiores, em corais longe dos recifes (RIPPE et al., 2019).

Quanto a prevalência, seus picos maiores apresentarm-se nos meses intensos de verão. Esses picos muito se dizem respeito as taxas de mortalidade e casos antigos do que de fato a taxa de casos novos (i.e. incidência de doenças sobre a população observada). A medição potencial da prevalência é usada como o primeiro passo para o manejo dessas doenças, de forma a avaliar em uma maior escala como esses animais estão sendo afetados (VAN WOESIK; RANDALL, 2017).

A prevalência pode estar relacionada por fatores exteriores bem como interiores. Um dos fatores externos pode ser a poluição por plástico. Nas idas em campo, muitas vezes foi visto restos de plásticos deixados principalmente pelos pescadores, bem como restos de cordas de *nilon* usadas nas redes de pesca. Para avaliação de um local ainda maior, seria o uso de modelagens como já foram feitos para locais como o Caribe (JORDÁN-DAHLGREN; JORDÁN-GARZA; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, 2018; LAMB et al., 2018). O presente trabalho apresenta um início para o entendimento de fatores focais e estressantes que podem desencadear a transmissão e a posterior morte de doenças em corais escleractíneos.

Em relação a progressão, quando extrapolados os dados, uma área com prevalência de corais de cerca de 1000 m² seria perdida em cerca de 7 anos. Esta estimativa consideraria a taxa de progressão hipotética apenas das duas doenças abordadas no trabalho sob as colônias e desconsideraria qualquer outro estresse focal, o que se realiza somente em trabalhos hipotéticos, uma vez que a literatura mostra que os corais podem estar submetidos a qualquer evento estressante, regional ou globalmente.

5. CONCLUSÃO

Conclui-se que as temperaturas apresentaram altas variações entre os meses estudados. Essas variações porém, não foram estatisticamente suficientes para desencadear a prevalência das doenças, prevalência esta que assim manteve-se constantemente em alta nos meses de pico do verão. Concluiu-se também que as duas áreas não apresentaram diferenças entre si no que diz respeito a incidência e prevalência das doenças.

O estudo procurou abranger todas as doenças principalmente em *S. stellata*, e essa se mostrou susceptível a todas as doenças anteriormente catalogadas. Contudo, as doenças comumente vistas nas áreas adjacentes e na população marcada foram as doenças da Banda Vermelha e da Praga Branca.

Quanto a prevalência e incidência destas sobre as colônias, os dados mostraram que muitas vezes os casos novos não eram exatamente o que fazia os valores de prevalência por momento aumentar, e sim, a morte de muitas colônias em um curto espaço de tempo, mostrando assim com os números zerados de incidências.

Este trabalho apresenta o primeiro trabalho experimental de acompanhamento *in situ* para a Paraíba, e o primeiro focado nas incidências e prevalências dessas doenças para a espécie endêmica *S. stellata*. Desta forma, ele é de vital importância para os trabalhos seguintes de forma a relacionar outros aspectos da saúde dos corais com o que é demonstrado nesse estudo.

REFERÊNCIAS

ANTONIUS, A. 1985. Coral Diseases in the Indo-Pacific: A First Record. **Marine Ecology**, v. 6, n. 3, p.197-218.

AVELINO, C.D. **Estrutura de tamanho e estado de saúde de corais recifais, com ênfase em *Siderastrea* spp.** Trabalho de conclusão de curso (Bacharel em Ciência Biológicas) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Estadual da Paraíba. Campina Grande, p. 42. 2017.

CASTRO, C. B.; PIRES, D. O. 1999. A bleaching event on a Brazilian coral reef. **Revista Brasileira de Oceanografia**, v. 47, n. 1, p.87-90.

BOURNE, D. G.; MORROW, K. M.; WEBSTER, N. S.. 2016. Insights into the Coral Microbiome: Underpinning the Health and Resilience of Reef Ecosystems. **Annual Review of**

Microbiology, v. 70, n. 1, p.317-340.

DIAS, T. L. P. & GONDIM, A. I. 2016. Bleaching in scleractinians, hydrocorals, and octocorals during thermal stress in a northeastern Brazilian reef. **Marine Biodiversity**, v. 46, n. 1, p. 303-307.

FUESS, L. E. et al. 2018. Transcriptional analyses provide new insight into the late-stage immune response of a diseased Caribbean coral. **Royal Society Open Science**, v. 5, n. 5, p.1-13.

FRANCINI-FILHO, R. B., REIS, R. M., MEIRELLES, P. M., MOURA, R. L., THOMPSON, F. L., KIKUCHI, R. K. P. & KAUFMAN, L. 2010. Seasonal prevalence of white plague like disease on the endemic Brazilian reef coral *Mussismilia braziliensis*. **Latin-American Journal of Aquatic Research**, v. 38, n. 2, p. 292-296.

GALLOWAY, S.B., BRUCKNER, A.W., WOODLEY, C.M. (eds.), 2009. **Coral Health and Disease in the Pacific: Vision for Action**. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 97 and CRCP 7. National Oceanic and Atmospheric Administration, Silver Spring, MD 314pp.

GONDIM, A. I., DIAS, T. L. P., CAMPOS, F. F., ALONSO, C. & CHRISTOFFERSEN, M. L. 2011. Macrofauna benthica do Parque Estadual Marinho de Areia Vermelha, Cabedelo, Paraíba, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 11, n. 2, p. 75-86.

HAAPKYLÄ, Jessica et al. 2011. Seasonal Rainfall and Runoff Promote Coral Disease on an Inshore Reef. **Plos One**, v. 6, n. 2, p.1-10.

HAYES, R. L. & GOREAU, N. I. 1998. The significance of emerging diseases in the tropical coral reef ecosystem. **Revista de Biologia Tropical**, v. 5, n. 46, p. 173-185.

KOHLER, K. E. & GILL, S. M. 2006. Coral Point Count with Excel extensions (CPCe): A Visual Basic program for the determination of coral and substrate coverage using random point count methodology. **Computers and Geosciences**, v. 32, n. 9, p. 1259-1269.

HUGHES, T. P. et al. 2017. Coral reefs in the Anthropocene. **Nature**, v. 546, n. 7656, p.82-90.

JOHAN, Ofri et al. 2016. Prevalence and Incidence of Black Band Disease of Scleractinian Corals in the Kepulauan Seribu Region of Indonesia. **Diversity**, v. 8, n. 4, p.1-11.

JONES, Rj et al. 2004. Dynamics of a temperature-related coral disease outbreak. **Marine Ecology Progress Series**, v. 281, p.63-77.

JORDÁN-DAHLGREN, Eric et al. 2018. Coral disease prevalence estimation and sampling design. **Peerj**, v. 6, p.1-12.

- LABOREL, J. 1969. Les peuplements de madréporaires des côtes tropicales du Brésil. **Annales de L'Université D'Abidjan**, v. 260, n. 3, p. 7-260.
- LAMB, Joleah B. et al. Seagrass ecosystems reduce exposure to bacterial pathogens of humans, fishes, and invertebrates. **Science**, v. 355, n. 6326, p.731-733.
- LAMB, Joleah B. et al. 2018. Plastic waste associated with disease on coral reefs. **Science**, v. 359, n. 6374, p.460-462.
- LEÃO, Zelinda M.a.n.; KIKUCHI, Ruy K.p.; TESTA, Viviane. 2003. Corals and coral reefs of Brazil. **Latin American Coral Reefs**, p. 9-52.
- LEÃO, Zelinda M. A. N. et al. 2016. Brazilian coral reefs in a period of global change: A synthesis. **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 64, n. 2, p.97-116.
- LEGGAT, William P. et al. 2019. Rapid Coral Decay Is Associated with Marine Heatwave Mortality Events on Reefs. **Current Biology**, p.1-2, v. 29, n. 16, p. 2723-2730.
- LIBRO, S.; VOLLMER, S. V. 2016. Genetic Signature of Resistance to White Band Disease in the Caribbean Staghorn Coral *Acropora cervicornis*. **Plos One**, v. 11, n. 1, p.1-11.
- LOUGH, J. M.; VAN OPPEN, M. J. H. 2018. Introduction: Coral Bleaching–Patterns, Processes, Causes and Consequences. p.1-5. In: VAN OPPEN, M. J. H. & LOUGH, J. M. (Eds.). *Coral Bleaching. Series Ecological Studies*. Springer International Publishing.
- LOURENÇO, L. J. S., CRISPIM, M. C. & ELOY, C. C. 2015. Caracterização do parque estadual marinho de Areia Vermelha, Cabedelo, PB, baseado na diversidade e abundância dos cnidários da classe anthozoa, como subsídio para o zoneamento ecológico econômico. **Gaia Scientia**, v. 9, n. 1, p. 134-140.
- MAYNARD, J et al. 2015. Projections of climate conditions that increase coral disease susceptibility and pathogen abundance and virulence. **Nature Climate Change**, v. 5, n. 7, p.688-694.
- MIRANDA, R. J., CRUZ, I. C. S. & LEÃO, Z. M. A. N. 2013. Coral bleaching in the Caramuanas reef (Todos os Santos Bay, Brazil) during the 2010 El Niño event. **Latin-American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 2, p. 351-360.
- POLLOCK, F. J., et al. 2017. White Syndrome-Affected Corals Have a Distinct Microbiome at Disease Lesion Fronts. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 83, n. 2, p.1-16.
- PRECHT, William F. et al. Unprecedented Disease-Related Coral Mortality in Southeastern Florida. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p.1-6, 2016.

RANDALL, C. J.; VAN WOESIK, R. 2017. Some coral diseases track climate oscillations in the Caribbean. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-8.

RANDALL, C. J.; VAN WOESIK, R. 2015. Contemporary white-band disease in Caribbean corals driven by climate change. **Nature Climate Change**, v. 5, n. 4, p.375-379.

RAYMUNDO, L. J., COUCH, C. S. & HARVELL, C. D. (eds). 2008. **Coral disease handbook: Guidelines for assessment, monitoring and management**. Coral Reef Targeted Research and Capacity Building for Management Program. University of Queensland, Centre for Marine Studies, St Lucia QLD, Australia. www.gefcoral.org. 121 pp.

REED, K; MULLER, E. M.; VAN WOESIK, R. 2010. Coral immunology and resistance to disease. **Diseases of Aquatic Organisms**, v. 90, n. 2, p.85-92.

RIPPE, John P et al. 2019. Differential disease incidence and mortality of inner and outer reef corals of the upper Florida Keys in association with a white syndrome outbreak. **Bulletin of Marine Science**, v. 95, n. 2, p.305-316.

SMITH, Jennifer E. et al. 2006. Indirect effects of algae on coral: algae-mediated, microbe-induced coral mortality. **Ecology Letters**, v. 9, n. 7, p.835-845.

TOUT, Jessica et al. 2015. Increased seawater temperature increases the abundance and alters the structure of natural *Vibrio* populations associated with the coral *Pocillopora damicornis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, p.1-12.

VAN WOESIK, R.; RANDALL, C. J. 2017. Coral disease hotspots in the Caribbean. **Ecosphere**, v. 8, n. 5, p.1-10.

WEBSTER, N. S.; REUSCH, Thorsten B. H. 2017. Microbial contributions to the persistence of coral reefs. **The ISME Journal**, v. 11, n. 10, p.2167-2174.

WILD, C., HUETTEL, M., KLUETER, A., KREMB, S. G., RASHEED, M. Y. M. & B. JØRGENSEN, B. B. 2004. Coral mucus functions as an energy carrier and particle trap in the reef ecosystem. **Nature**, v. 428, n. 6978, p. 66-70.

WILLIAMS, de; MILLER, Mw. 2005. Coral disease outbreak: pattern, prevalence and transmission in *Acropora cervicornis*. **Marine Ecology Progress Series**, v. 301, p.119-128.

WOODLEY, C. M., DOWNS, C. A., BRUCKNER, A. W., PORTER, J. W. & GALLOWAY, S. B. 2016. **Disease of Coral**. New Jersey: Wiley Blackwell, 582 pp.

ZIEGLER, M. et al. 2017. Bacterial community dynamics are linked to patterns of coral heat tolerance. **Nature Communications**, v. 8, p.1-8.

CAPÍTULO 2

Manuscrito a ser submetido ao periódico *Coral Reefs*

Mudanças à nível histológico das doenças Praga Branca e Banda Vermelha, em tecido do coral endêmico *Siderastrea stellata* (Cnidaria: Scleractinia)

Camile Dias Avelino & Thelma Lúcia Pereira Dias

Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Universidade Estadual da Paraíba, Laboratório de Biologia Marinha, CCBS, Departamento de Biologia, Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, PB, Brasil.

ABSTRACT

The coral organism is equipped with a primitive immune system that suffers from the slightest variation in temperature, salinity, turbidity and excess or lack of nutrients in the ocean water. Coral diseases are believed to be late reactions to extreme stress events, such as thermal anomalies and mass bleaching. Thus, the present study had as objectives; observe through histological techniques the effects of diseases on the coral tissue. The collection of the *Siderastrea stellata* tissue was performed on two beaches on the northeast coast of Brazil. For the analysis of tissues, different staining methods were implemented, being specific for staining and analysis of the presence and absence of bacteria, fungi and for the analysis of general morphology. For the analysis, only the soft tissue, resulting from the descaling of the samples, was used and to evaluate the differences between the same individual, the collection of material from three areas of a colony was performed. There were two diseases studied, the Red Band disease and the White Plague disease. The main differences found between the disease were the greater amount of red band samples found with colonies of bacteria and fungi, while the sampling of the white plague disease suggested the presence of diatoms and cyanobacteria. The results showed necrosis in different stages, with deep initial necrosis and band area with delimitation of the presence of bacteria in the diseased part of the coral affected by red band. Through the results, it was concluded that the stage seen with the naked eye of the two diseases studied, is the advanced stage of disease progression and consequent tissue colony necrosis. The results bring a critical look to the need for a basic form of prevention or future remedies.

Key-words: Northeastern Brazil, innate immunity, coral bleaching

RESUMO

O organismo dos corais é equipado com um primitivo sistema imunológico que sofre com a mínima variação de temperatura, salinidade, turbidez e excesso ou falta de nutrientes na água do oceano. Acredita-se que as doenças em corais são reações tardias a eventos de extremo estresse, como o caso de anomalias térmicas e branqueamento em massa. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos; observar através de técnicas histológicas os efeitos das doenças sob o tecido do coral. A coleta do tecido de *Siderastrea stellata* foi realizada em duas praias do litoral nordeste do Brasil. Para a análise dos tecidos, diferentes métodos de coloração foram implantados, sendo eles específicos para coloração e análise da presença e ausência de bactérias, fungos e para a análise da morfologia geral. Para a análise, somente o tecido mole, resultado da descalcificação das amostras, foi utilizado e para avaliar as diferenças entre um mesmo indivíduo, a coleta de material de três áreas de uma colônia, foi realizada. As doenças estudadas foram duas, a doença da Banda Vermelha e a doença da Praga Branca. As principais diferenças encontradas foram entre as doença maior quantidade de amostras de Banda vermelha encontradas com colônias de bactéria e fungos, enquanto a amostragem da doença da praga branca sugeriu a presença de diatomáceas e cianobactérias. Os resultados demonstraram necrose em diferentes estágios, com necrose inicial profunda e área de banda com delimitação de presença de bactérias na parte doente do coral acometido por banda vermelha. Através dos resultados, concluiu-se que o estágio visto a olho nu das duas doenças estudadas, se trata do estágio avançado de progressão da doença e consequente necrose tecidual da colônia. Os resultados trazem um olhar crítico a necessidade de uma forma de base para prevenções ou remediações futuras.

Palavras-chave: Nordeste do Brasil, imunidade inata, branqueamento de corais

INTRODUÇÃO

O organismo dos corais é equipado com um primitivo sistema imunológico que sofre com a mínima variação de temperatura, salinidade, turbidez e excesso ou falta de nutrientes na água do oceano. O branqueamento nos corais causa instabilidade no sistema imunológico, deixando-os abertos à agentes infecciosos causadores de doenças (WOODLEY et al., 2016).

No mundo, ainda pouco se sabe sobre como surgem as doenças e o que interfere na suas taxas de progressão e no Brasil pouco ainda foi feito tratando as doenças como foco principal, principalmente se tratando de como as doenças afetam a morfologia interna de um pólipos e do tecido mole do coral. Sabe-se, porém, que tanto doenças como eventos de branqueamento em massa tem acarretado perda de biodiversidade, muitas vezes, endêmica como quando afetam indivíduos de *Siderastrea stellata* e *Mussismilia brasiliensis*, presentes na região do sul da Bahia (FRANCINI-FILHO et al., 2010).

O Brasil foi uma das áreas afetadas pelo branqueamento de 2010, que causou a debilitação de corais, hidrocorais e octocorais na costa do nordeste brasileiro, com registros feitos na Paraíba (DIAS; GONDIM, 2016). Após o branqueamento ocorrido na costa da Paraíba, respostas como mudanças na pigmentação normal dos corais foram observadas, bem como o surgimento de estágios iniciais de doenças tanto em colônias que seguiram com a resiliência, quanto em colônias ainda com partes branqueadas. Essa observação foi realizada em unidades de conservação e em áreas próximas, demonstrando a abrangência de corais afetados. É importante ressaltar que, estudos comparativos do retorno das condições normais dos corais, em áreas protegidas e em áreas abertas, ainda são escassos (SASSI et al., 2015).

Acredita-se que as doenças em corais são reações tardias a eventos de extremo estresse, como o caso de anomalias térmicas e branqueamento em massa (MILLER et al., 2009). Como classificação, colocam-se em dois principais grupos, as doenças de banda e as doenças brancas. Em sua maioria, as doenças de banda apresentam as maiores taxa de progressão com pouca ou nenhuma chance de resiliência. Enquanto que, as doenças brancas, são aquelas que vem acompanhadas em sua maioria de colônias de bactérias associadas a perda de tecido (AINSWORTH; KRAMASKY-WINTER; LOYA; HOEGH-GULDBERG; FINE, 2006).

O coral por si só possui em seu sistema e superfície uma série de bactérias e outros microorganismos que juntos formam a microbiota amiga de um coral. Essa microbiota é uma parte importante no funcionamento correto do coral e muda de tempo em tempo, e quando ela

sofre com efeitos pontuais ou severos do meio, ela perde a sua função e equilíbrio e pode representar uma ameaça a vida da colônia hospedeira (EPSTEIN et al., 2019; OSMAN et al., 2020; LIMA et al., 2020).

A maior parte das doenças estudadas hoje, são causadas por associação de bactérias ou fungos. Cada uma das doenças possui um padrão diferente, e é por esse motivo que torna-se possível a identificação da maioria das doenças em campo. Todavia, vários casos de doenças semelhantes foram relatados em diferentes locais, com os mesmos sintomas em níveis histológicos mas causados por diferentes patógenos (AEBY et al., 2011; KELLY et al., 2016).

No sentido regional, as doenças conhecidas para o Brasil, já haviam sido relatadas aqui e em outros lugares do mundo, e destacam-se como um problema em potencial quando observadas em grandes quantidades em locais de áreas de proteção e com turismo moderado (FRANCINI-FILHO et al., 2013; LEÃO et al., 2016).

Como meios de sanar problemas desencadeados pelas doenças de corais no Brasil, estudos estão sendo cada dia mais produzidos com diferenças abordagens para resolver e entender o problema das doenças dos corais. Dentre tantos os estudos, Tedesco et al. (2017) propõe uma abordagem multidisciplinar para a conservação dos corais brasileiros, inclusive quanto às relações com as doenças.

Utilizando-se de pesquisas internacionais que procuram sanar as dúvidas em relação as doenças de corais à níveis macro e micro em espécies cosmopolitas, criaram-se hipóteses de como essas doenças afetam espécies endêmicas e de distribuição restrita, afim de entender a amplitude dos malefícios das doenças a nível de recife, estudando-se o micro delas.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo principal observar, através de técnicas histológicas, os efeitos das doenças sob o tecido do coral, analisando-os em meio a progressão da doença as áreas saudáveis e já afetadas do coral. Utilizou-se como respostas a presença de patógenos possivelmente nocivos e a observação quanto a outros epibiontes, como uma forma de base para prevenções ou remediações futuras.

MATERIAL E MÉTODOS

Áreas de estudo

O estudo foi realizado em duas formações recifais costeiras situadas no litoral da Paraíba, a saber: recifes da Praia do Seixas e recifes da Praia de Pitumbu, ambas submetidas ao turismo.

Recifes da Praia do Seixas

A Praia do Seixas (7°09'21"S, 34°47'10"W) é caracterizada por formações recifais aparentes na maré baixa há cerca de 500 m da praia apresentando áreas com profundidade de poucos centímetros na maré baixa. Suas formações recifais servem como habitat, refúgio e alimento para muitos animais como espécies de peixes e invertebrados. Por se tratar de uma formação muito próxima à praia, esses corais sofrem intensa influência de quebra de onda, que diminui a visibilidade da água principalmente nos meses do inverno, e o aumento na temperatura da água (DIAS & GONDIM, 2016). A formação recifal ocupa uma área de cerca de 1km² em que toda essa área apresenta diferentes características subaquáticas.

Por se tratar de uma área muito próxima a região metropolitana de João Pessoa, capital do estado, ela está sujeita a forte ação do turismo, com muitos *caiaqueiros*, atividade pesqueira costeira e barcos de visitação turística que ancoram nas áreas das piscinas e chamam atenção dos turistas pelas águas cristalinas no verão (**Fig. 1a**).

A Praia do Seixas está entre as áreas atingidas pelo evento de branqueamento em massa que ocorreu em 2010. Na época foram registrados corais e octocorais com suas estruturas físicas completamente branqueadas em decorrência do aumento da temperatura na água superficial (DIAS & GONDIM, 2016). Atualmente, esta área localiza-se nos limites da Área de Proteção Ambiental Naufrágio do Queimado, unidade de conservação estadual criada no final de 2018.

Praia de Pitumbu

A Praia de Pitumbu (7°28'16"S, 34°48'15"W) está localizada há 57 km da capital do estado, João Pessoa, situada ao sul do estado da Paraíba, no município de Pitumbu, quase fazendo divisa com o litoral pernambucano. Seus recifes possuem características semelhantes aos outros dois locais de estudo, com formações recifais que distam entre 0,6 e 1,5 km da praia.

A profundidade dos recifes varia de poucos centímetros a 6 m, na maré baixa.

A fauna é composta por invertebrados que realizam bioerosão, como a presença do ouriço-preto (*Echinometra lucunter*), peixes, corais pétreos e uma grande abundância de hidróides calcários da espécie *Millepora alcicornis*. A área segue o mesmo regime de maré dos outros dois locais de estudo, com água turva nos meses de inverno e com melhor visibilidade nos meses de outubro a abril (**Fig. 1b**).

Apesar da formação recifal se assemelhar com as outras e com as formações recifais ao longo da costa do Nordeste, a praia de Pitimbu é pouco estudada. Tem-se poucas informações sobre levantamentos de fauna marinha e de seus usos. Um dos grandes fatores que acarreta isso, é a distância da praia da capital do estado e o tempo de deslocamento até ela, fazendo com que a área seja mais frequentemente usada pela população local através da pesca costeira e o número de turistas ainda é inferior ao observado em áreas recifais mais próximas a capital.

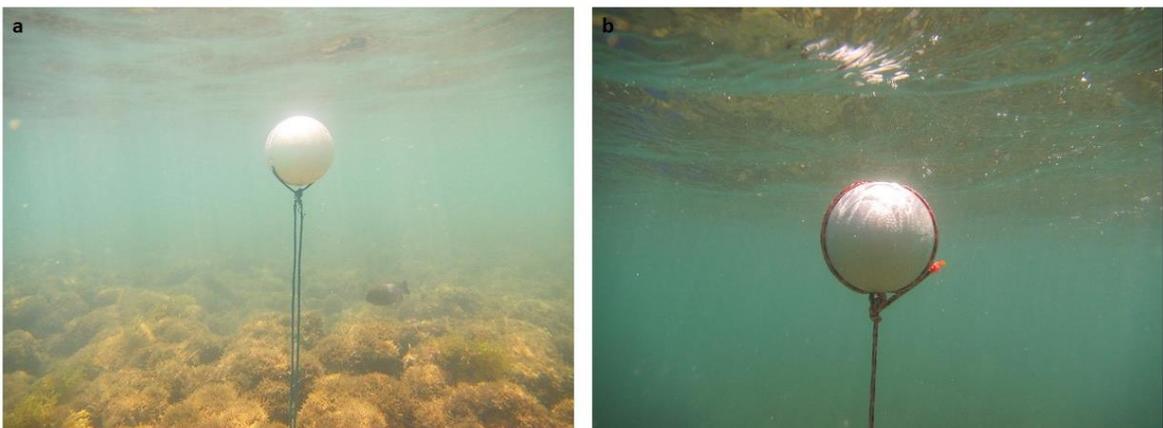


Figura 1. Fotos das bóias marcadoras do experimento como referência de turbidez da água. (a) Bóia na área onde foram coletados os tecidos dos corais na Praia do Seixas e (b) bóia na área onde foram coletados os tecidos dos corais na Praia de Pitimbu. Fotos: Camile Avelino.

Desenho amostral

Coleta do tecido

A coleta de tecido foi realizada através de mergulho livre (*snorkeling*) no mês de maio de 2019. Para coleta do tecido, foi feita uma retirada com ajuda de sisal e martelo, de amostra de tecido mole juntamente com o esqueleto calcário, com cerca de 3 cm de diâmetro, de três áreas do coral com sintomas das doenças da Praga Branca e Banda Vermelha tentando preservar ao máximo a integridade do restante da colônia (**Figura 2**). As áreas são elas: área visivelmente sem sintoma (**A1**), área da banda da doença (**A2**) e área em processo de necrose do tecido (**A3**) (**Fig. 2**).

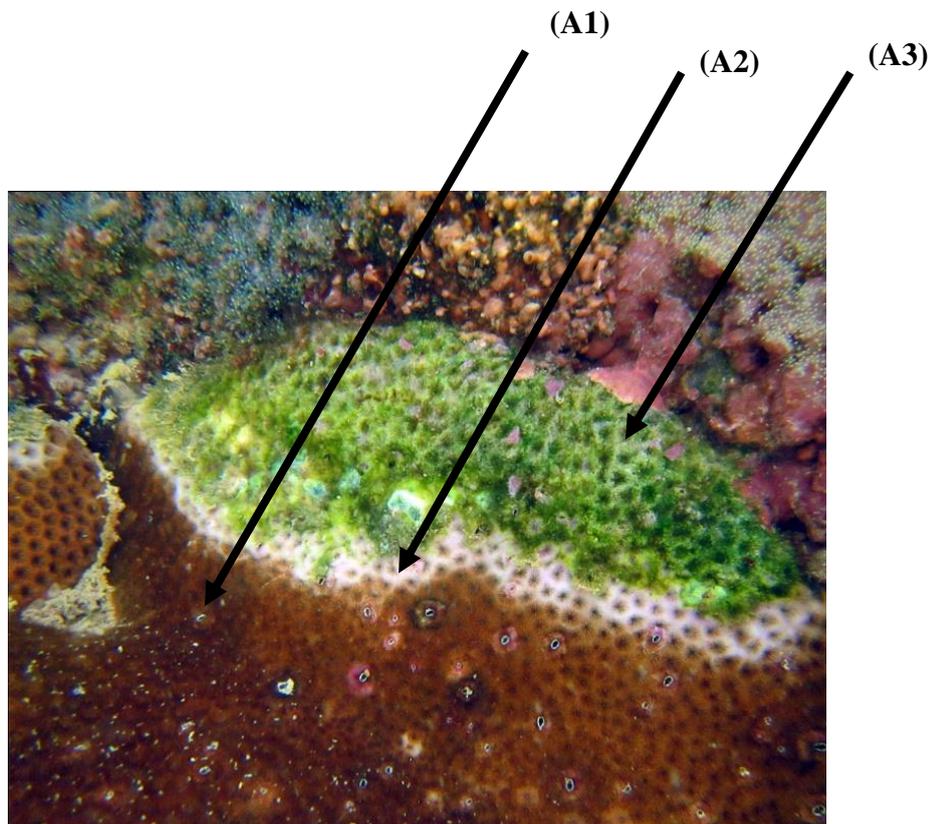


Figura 2. Exemplo esquemático da coleta de tecido. (A1) Área da colônia visualmente saudável, (A2) banda da doença e (A3) área necrosada. Foto: Camile Avelino.

Preparação do tecido

Os fragmentos de tecido foram fixados no momento da coleta em formalina tamponada neutra, sendo obtida com a mistura de 15% de formoldeído à 37% e 85% de água do mar anteriormente filtrada em laboratório, adaptando o protocolo de Work (2013) para práticas histológicas em corais. Cada fragmento foi colocado em um saco de plástico com etiqueta referenciada, de amostra e local.

Após a coleta e a fixação dos tecidos *in loco* eles foram levados para o laboratório e deixados descansar no fixador por 7 dias para então serem levados para descalcificação.

A descalcificação foi feita utilizando a solução de formoldeído à 5%, ácido fórmico à 10% e 85% de água destilada. As amostras foram transferidas para recipientes de vidro e colocadas em processo de descalcificação por 9 a 11 dias, com trocas a cada 24 horas, a depender do tamanho da amostra de esqueleto, sendo o processo concluído quando sobrava somente o tecido mole do coral, flutuando na solução (**Fig. 3a e 3b**). Após a total descalcificação do esqueleto, os tecidos foram neutralizados em álcool 70% e armazenados para posterior corte e processo de desidratação.

Depois da descalcificação total das amostras, elas foram analisadas na lupa quanto a morfologia grosseira, se os pólipos e os tecidos continuavam conectados após a descalcificação e se havia epibiontes ou outros corpos vivendo diretamente ligado aos corais.

Os cortes dos tecidos foram feitos com ajuda de bisturi, de forma a preservar pólipos e cenênquima. Os tecidos cortados foram desidratados em série de álcool etílico com trocas a cada 24 horas, de álcool 70% à álcool absoluto, sendo dois banhos deste último. As amostras foram então parafinadas em cassetes e cortadas em micrótomo em fitas de 10 μm com três lâminas para cada amostra (i. e. lâminas para morfologia geral, lâminas para teste de bactérias e lâminas para teste de fungos).

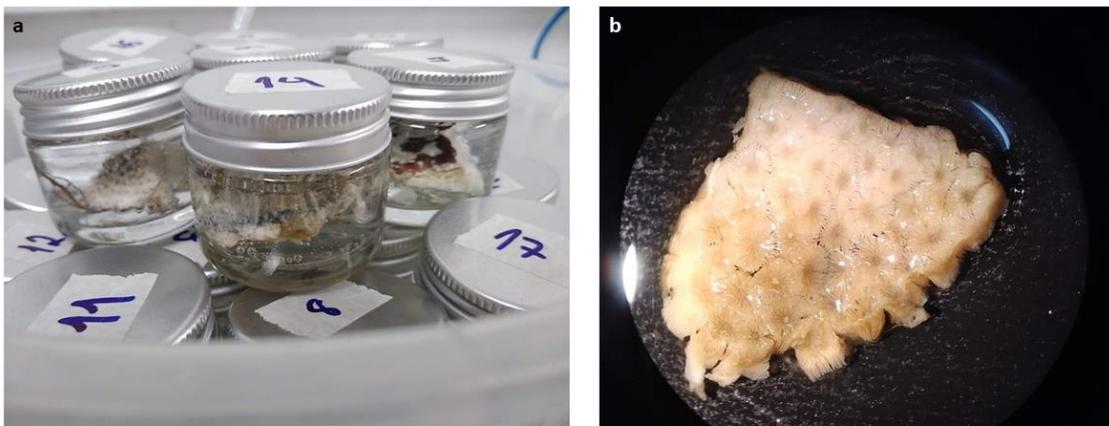


Figura 3. Tecidos em processo de descalcificação. (a) Tecidos colocado em colução de ácido fórmico e (b) tecido de área de banda (A2) após a descalcificação total do esqueleto. Fotos: Camile Avelino.

As lâminas foram todas levadas ao xilol puro para remoção da parafina e seguiram o mesmo protocolo de desidratação relatado anteriormente, com dois banhos finais de álcool absoluto. Cada uma delas seguiu então o protocolo específico para cada uma das colorações específicas, sendo elas: coloração em hematoxilina e eosina (HE) para as lâminas de morfologia, coloração de GRAM para as lâminas de bactérias e coloração de GROCOTT para fungos.

- Coloração Hematoxilina e eosina

Para a coloração em HE as lâminas, após a desparafinação, foram colocadas em banhos de sequência decrescente de álcool com dois banhos de álcool absoluto. As lâminas então foram colocadas em banho de hematoxilina por dez minutos, retiradas e lavadas em água corrente por cinco minutos.

Após a lavagem em água, as lâminas foram colocadas em solução de eosina por cinco minutos. Depois, foram levadas para a água corrente e lavadas por cinco minutos. As lâminas então foram encaminhadas para sequência crescente de banhos de álcool, com dois banhos de álcool absoluto, sendo levados para o xilol.

As lâminas foram montadas com lamínula e bálsamo de Eterlan e deixadas descansando por 48 horas para secagem total das lâminas.

- Coloração de GRAM

Para a coloração de GRAM as lâminas, após a desparafinação, foram colocadas em banhos de sequência decrescente de álcool com dois banhos álcool absoluto. As lâminas então foram colocadas distribuídas na bancada e secas com papel toalha, evitando contaminação cruzada.

Sob cada lâmina foi colocada uma gota de solução de violeta genciana fenicada por um minuto, deixando escorrer ao final sem lavar. A lâmina foi coberta com lugol fraco e deixado por também um minuto e então gotejada a solução descorante até que o líquido da lâmina se tornou totalmente incolor, o que aconteceu entre 15 e 30 segundos.

Após a solução descorante, as lâminas foram lavadas em água corrente e cobertas com a solução de fucsina por um minuto, lavadas com água corrente e deixadas em posição vertical para secar. As lâminas foram então montadas com lamínula e bálsamo de Eterlan e deixadas descansando por 48 horas para secagem total das lâminas.

- Coloração de GROCOTT

Para a coloração de GROCOTT, após a desparafinação, foi utilizado o kit Easy Path para coloração de fungos. As lâminas foram colocadas em banhos de sequência decrescente de álcool com dois banhos álcool absoluto, lavadas em água destilada e seguiram o protocolo adaptado por Marques (2015). As lâminas foram então montadas com lamínula e bálsamo de Eterlan e deixadas descansando por 48 horas para secagem total das lâminas.

Análise dos dados

As lâminas foram analisadas em relação à presença e ausência e presença de colônia de bactérias, disrupção do cenênquima, das células do epitélio, presença de zooxantelas nas células e presença de fungos.

Para demonstrar estatisticamente com as variáveis anteriormente apresentadas quanto a presença ou ausência de fungos e bactérias, células rompidas e outros, foi feito um teste de agrupamento. As variáveis foram plotadas em matriz e as semelhanças entre as amostras foram feitas com o uso de Cluster para alinhar as amostras semelhantes entre as áreas e entre as doenças. Para o Cluster foi utilizado o software estatístico R, com o pacote “ape” para as modificações necessárias no plot final. Além disso foram feitas outras análises descritivas de tudo o que foi observado nas lâminas quando comparadas com as lâminas controle.

RESULTADOS

Foram analisadas 42 amostras, sendo nove amostras da doença da Praga Branca (i. e. áreas A1, A2, A3) de três diferentes corais, nove amostras da doença da Banda Vermelha (i. e. áreas A1, A2, A3) de três diferentes corais e três amostras de um coral controle considerando hipotéticas áreas A1, A2 e A3 de diferentes regiões do coral.

Quando observadas em relação a morfologia grosseira, todas as amostras mantiveram sua estrutura organizada, mesmo as amostras de tecido em processo de necrose (A3). Em relação aos epibiontes, somente foi encontrado cirripédios (**Fig. 4c**), não identificados a nível de gênero, e larvas plânulas em processo de expulsão (i. e. localizadas na área do tecido mais próxima da boca) (**Fig. 4a e b**).

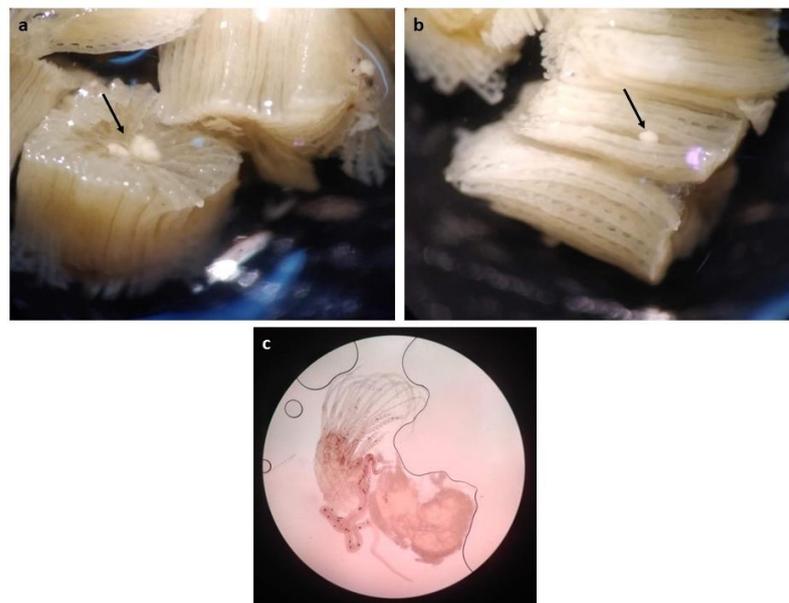


Figura 4. Morfologia grosseira do tecido mole após o processo de descalcificação, visualização em microscópio óptico de corpos estranhos entre os tecidos do coral. (a e b) Demonstram a presença de gameta fecundado no tecido de *S. stellata* e (c) presença de cerripédia não identificado. Fotos: Camile Avelino.

Após a morfologia grosseira realizada, as amostras foram cortadas em micrótomo e coradas com as três diferentes colorações. As lâminas com a coloração de HE foram avaliadas no microscópio quanto a presença de vacúolos e espaços abertos no tecido, indicando diferenças nas estruturas celulares nas três amostras de cada coral.

As amostras da doença da Praga Branca, mostraram início de processo de necrose, tanto em A2 quanto em A3 (**Fig. 5a, b e c**). Quando comparadas as lâminas de coral controle da mesma área, as perdas mais visíveis são a da formação do tecido epitelial, a diminuição da abundância de zooxantelas, além da presença de vacúolos em tecido com início de necrose e o núcleo difuso em células de corais doentes, diferente do que é encontrado em coral visivelmente saudável (**Fig. 5f**).

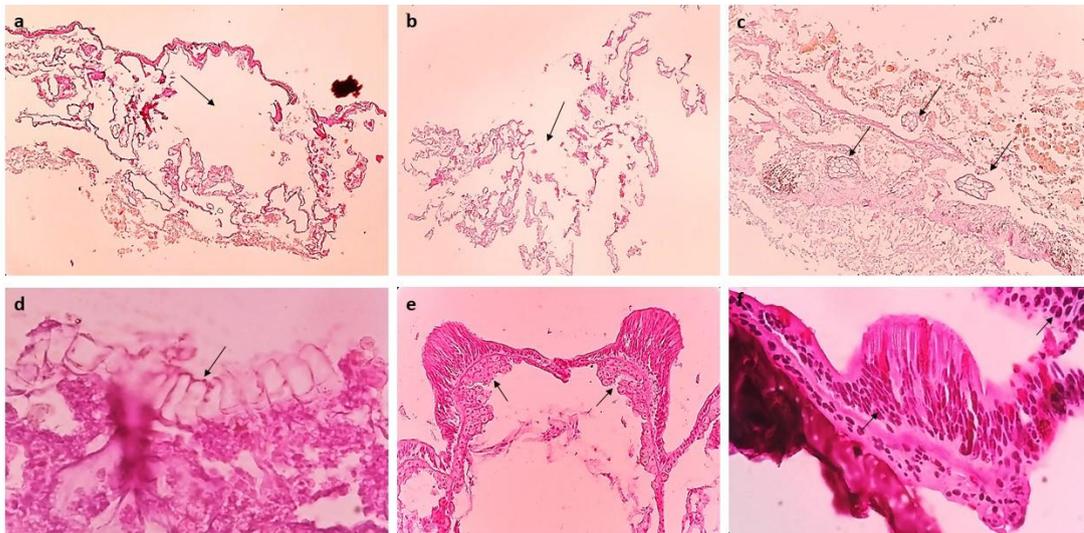


Figura 5. Análise das lâminas quanto a morfologia das três áreas do coral coletado. Presença de (a) e (b) espaços necrosados em lâminas de A3, como indicados pelas setas, (c) presença de vacúolos em lâminas de A3 e em comparação com corais controle mostrando (d) o epitélio do coral preservado, (e) abundância de zooxantelas em áreas próximas a boca e (f) núcleos das células preservados e paredes sem extravasamento de conteúdo. Fotos: Camile Avelino.

Outra diferença comumente encontrada entre os tecidos de coral controle e a área A1 de corais doentes, são as estruturas secretoras de muco que, em corais doentes, foram encontradas aumentadas e em grande parte, com colônias de bactérias próximas. A estrutura secretora de muco fica partida e perde sua estrutura original, além de em todas as lâminas terem sido observadas também extravasamento do conteúdo das células.

Uma característica ainda mais particular quando encontradas as estruturas, é a quebra parcial ou total do espaço celular que a protege (**Fig. 6a**) enquanto que em tecido saudável, as estruturas são protegidas pelo envoltório de células e possuem tamanhos normais (**Fig. 6b**).

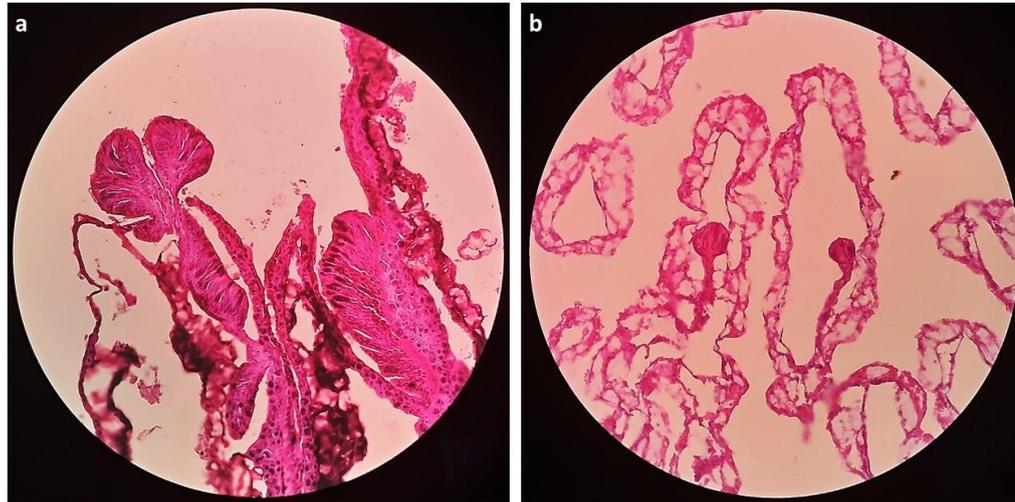


Figura 6. Presença de estruturas secretoras de muco. É possível observar (a) a presença de estrutura secretoras de muco maiores e (b) estruturas secretoras de muco de tamanho normal entre os tecidos do coral. Fotos: Camile Avelino.

Amostras de área saudável em dois corais da população do Seixas, mostraram a presença de ovos em desenvolvimento e ligados ao tecido com formação das células visíveis e larvas já em desenvolvimento e divisão celular formando uma massa densa, e separadas do tecido como é possível observar nas figuras 7c e 7d.

Os ovos em formação apresentavam núcleo denso e um envoltório que não envolvia totalmente a massa de células e parte se ligava ao tecido de formação do coral e células pequenas e sem núcleo visível (**Fig. 7a e b**).

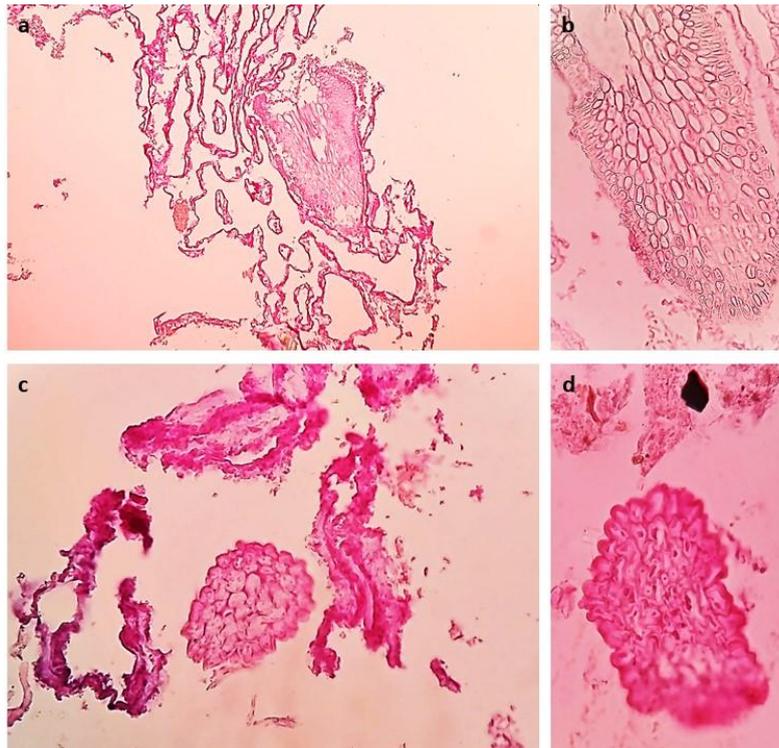


Figura 7. Presença de ovos e larvas plânula entre os tecidos de *S. stellata*. Presença de (a) ovo em formação entre os tecidos do coral com indícios de início de necrose, (b) com o ovo ainda em formação. (c) Larva plânula desprendida do tecido do coral mostrando (d) aglomerado de células a ser liberado pelo coral. Fotos: Camile Avelino.

Quando coradas com a coloração de GRAM, foi possível observar organismos com estruturas semelhantes à segmentação, quando aumentadas em visualização máxima de 100x com óleo de imersão, foram possíveis de serem identificadas como diatomáceas (**Fig. 8a, b e c**). No entanto, não foram identificadas a um nível taxonômico inferior pela dificuldade de visualização de como foi feita a amostragem dos corais. Todas as amostras identificadas com presença de diatomáceas eram amostras da doença da Praga Branca.

Em uma das amostras, parte da amostragem da população de Pitimbu, também com a doença da Praga Branca, as diatomáceas foram observadas dentro do que parece ser um tipo de vacúolo, também não identificado.

Além das diatomáceas, as lâminas coradas com GRAM foram um sucesso na interpretação visual de cianobactérias filamentosas (**Fig. 8f e g**). Assim como as diatomáceas, as cianobactérias não foram identificadas ao menor nível taxonômico pela ausência de melhores técnicas de coleta para observação e identificação precisa deste táxon.

Todas as amostras com cianobactérias eram amostragens de banda de doença (A2) e todas as identificadas eram da população coletada do Seixas. Todas as cianobactérias foram

confirmadas pela coloração como gram negativas (i. e. reproduzindo a cor rosa do contra-corante fucsina), o que é esperado de cianobactérias pela conformação da sua parede celular (**Fig. 8f**).

Assim como as diatomáceas e as cianobactérias, em amostras de corais acometidos pela doença da Praga Branca da população do Seixas, foram observadas estruturas que assemelham-se a ovos de helmintos, precisando de confirmação com técnicas melhores de coleta.

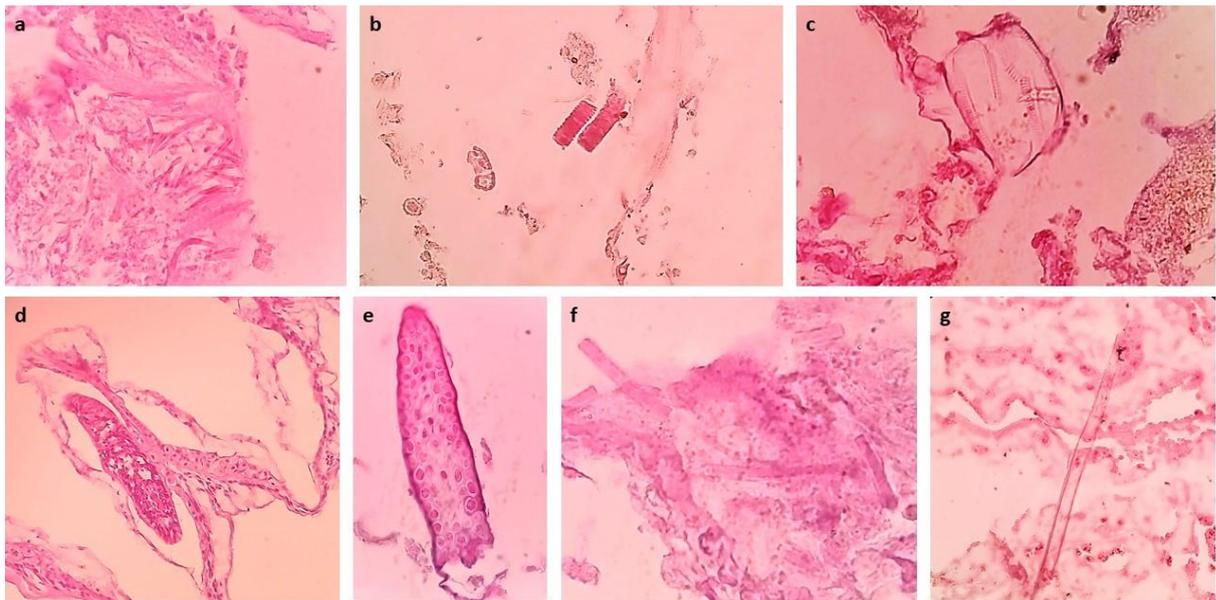


Figura 8. Presença de corpos estranhos entre os tecidos de corais das variadas amostras. (a), (b) e (c) mostram a presença de diatomáceas não identificadas, enquanto (d) e (e) assemelham-se com helmintos e (f) e (g) mostram a presença de cianobactérias, confirmadas através da coloração de GRAM em que se mostraram gram negativas. Fotos: Camile Avelino.

Quando observadas a presença de bactérias e fungos, assim como modificações estruturais das células em tecido da área de banda dos corais (A2), as lâminas foram coradas com GRAM e GROCOTT, cada coloração para um indivíduo específico. Para tanto, o tecido foi cortado horizontalmente em relação ao pólip.

O que pôde ser observado foi a presença de bactérias GRAM positivas no lado doente e a não coloração no lado saudável (i. e. ainda não atingido pela doença e sem sinal de necrose tecidual). Outro detalhe que foi visível na grande parte das amostras de A2, foi a necrose do tecido na área doente e do lado saudável, a formatação das células se manteve normal quando comparada aos controles com o mesmo tipo de cortes histológicos (**Fig. 9**).

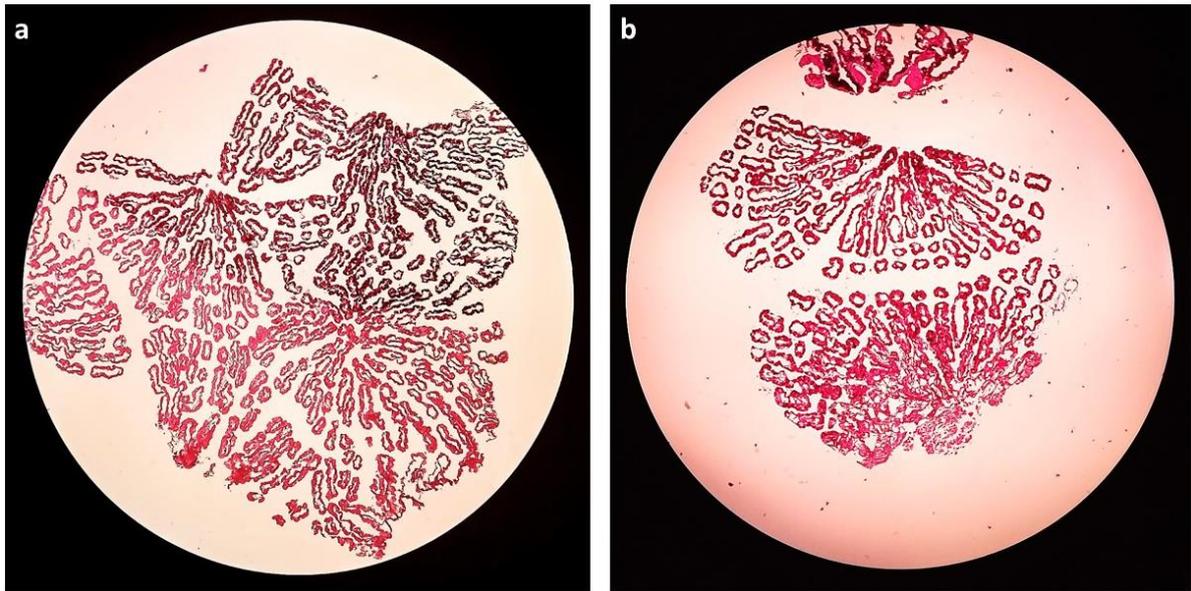


Figura 9. Lâminas de área de banda da doença (A2) vistas em microscopia óptica com 40x de aumento. As imagens mostram a distinção entre as áreas doentes e visivelmente saudáveis como (a – parte superior) quando coradas com coloração de GRAM corou facilmente com violeta genciana pela presença de colônia de bactérias e (b) a diferença entre a área de banda de um lado (parte inferior) tecido em processo de necrose e outro com tecido preservado. Fotos: Camile Avelino.

Graças à coloração com cromo, seguindo o protocolo para GROCOTT, foi possível observar e conhecer na lâmina a presença de agregações fúngicas. Os fungos, quando presentes nas amostras, eram facilmente observados quanto a sua presença por se destacarem em cor geralmente preta do restante do tecido circundante (**Fig. 11b**).

Todas as amostras com presença de fungo foram amostras de A2 e A3 da população de Pitimbu. Todas vezes que foi presente, os fungos estavam agregados (**Fig. 11**) e não apresentavam baixa na densidade das zooxantelas próximas como no caso das bactérias (**Fig. 11d**).

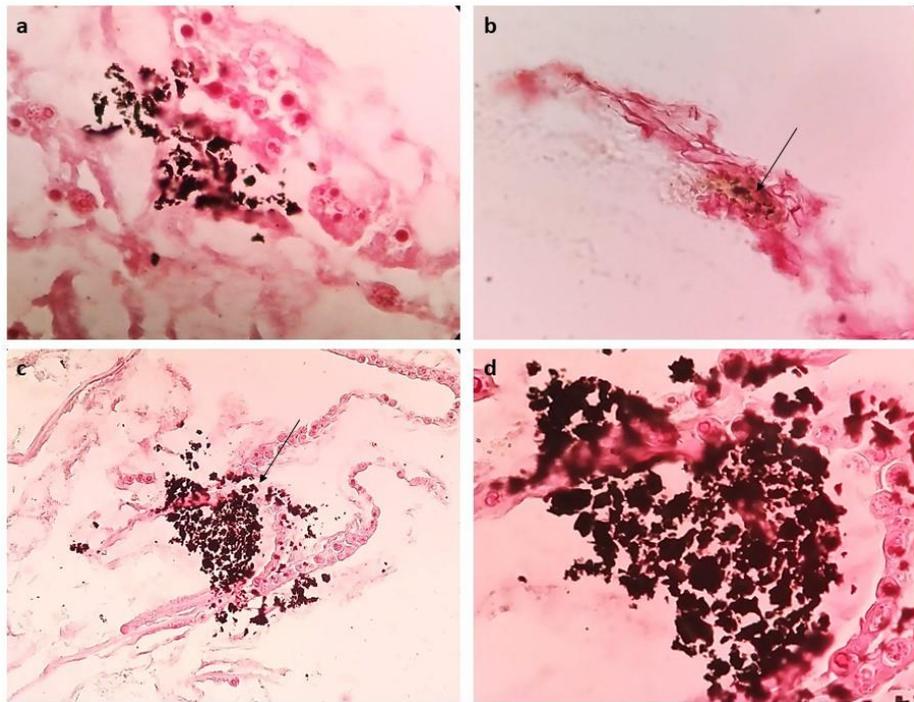


Figura 10. Lâminas coradas com coloração de GROCOTT com presença de fungos. (a) Fungos entre o tecido do coral, próximo as zooxantelas em lâminas de banda de doença com aumento em 100x e (b) aumento em 10x. O mesmo se repete em (c) com aumento de 10x e, finalmente, (d) quando aumentado em 100x. Fotos: Camile Avelino.

No teste de agrupamento, foi possível visualizar como as amostras de A1 e A3 ficaram longe umas das outras, somente com todas as áreas do coral controle pertencendo ao mesmo grupo, como no caso da amostra S7 e C7, amostras controles da população do Seixas e de Pitimbu, respectivamente (**Fig. 11**)

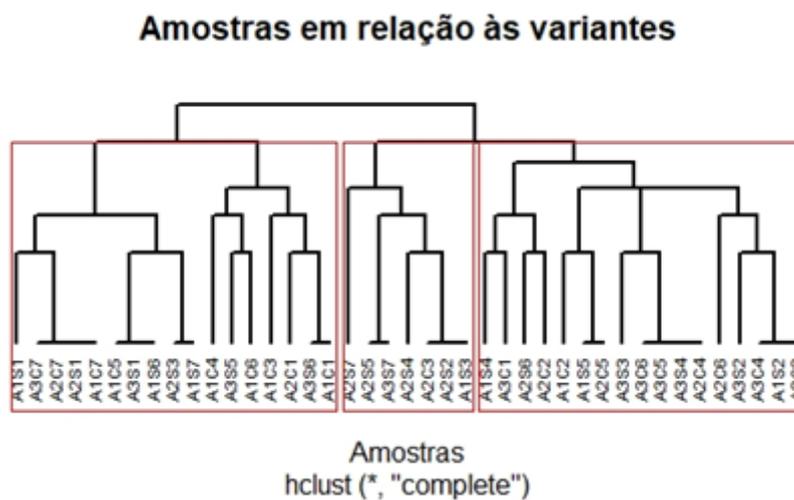


Figura 11. Teste de agrupamento por amostra. Foi dividido em três grupos distintos, mostrando principalmente a diferenciação entre as amostras de tecido doente (A3) e as de tecido visivelmente saudáveis (A1) e controles (C7 e S7).

DISCUSSÃO

Contrastando com trabalhos realizados somente em campo para espécies endêmicas, afim de determinar os efeitos maléficos a fundo das doenças em corais, o presente estudo focou em demonstrar como as doenças visíveis são os estágios avançados de uma doença assintomática, analisando os tecidos e os patógenos em potencial das doenças comumente encontradas.

As larvas encontradas próximas a boca mesmo quando analisada a morfologia a grosso modo das amostras apontam que no momento da coleta, em maio de 2019, os espécimes estavam prontos para o momento de desova. Para a espécie *S. stellata* pouco ainda se tem registrado para a época de reprodução, mas é conhecida que a época de expulsão das larvas ocorre entre dezembro e janeiro em alguns locais como Búzios e fevereiro a meados de março em corais observados em Abrolhos (LINS-DE-BARROS; PIRES; CASTRO, 2003), mas nunca ocorrendo durante o mês maio.

Diferente de outras espécies do gênero como a *Siderastrea siderea*, que é hermafrodita e possui sua reprodução feita através da expulsão dos ovos, a *S. stellata* é uma espécie gonocórica, assim como sua espécie críptica *S. radians* (MENEZES; NEVES; KIKUCHI; JOHANSSON, 2014; ST.GELAIS; CHAVES-FONNEGRA; MOULDING; KOSMYNIN; GILLIAM, 2016).

Essa presença de ovos em maio pode sugerir uma característica adaptativa da espécie. Porém, como somente amostras coletadas na praia do Seixas demonstraram essa presença, essa característica poderia estar mais ligada ao desequilíbrio ocasional na área ou como uma resposta a ação da doença.

A necrose do tecido está diretamente ligada com a ação degenerativa da doença, em outras doenças com causador identificado como bactéria, essa rápida necrose do tecido, como pôde ser observada nas amostras de corais com sinais de Banda Vermelha, está ligada à presença e ao crescimento da colônia bacteriana, sugerindo que os corais observados possuem como causador da doença, alguma espécie de bactéria (LUNA; BIAVASCO; DANOVARO, 2007).

Da mesma forma, a formação de vacúolos e a necrose que os seguem também são outro indicativo da presença de bactérias como em causadores de doenças como a doença da banda negra (BYTHELL; BARER; COONEY; GUEST; O'DONNELL; PANTOS; TISSIER, 2002), mais uma vez corroborando com a hipótese de que o patógeno responsável se trata de bactérias.

A densidade de zooxantelas é afetada por fatores atenuantes de temperatura e

visibilidade, com maior número de zooxantelas por célula em épocas de chuva e maior densidade em época de estiagem (COSTA; SASSI; AMARAL, 2004). Porém, o que foi observado nas amostras é que as amostras de um mesmo local, quando comparadas aos corais controle da mesma área, apresentaram menor densidade de zooxantelas por célula.

Quando comparadas as três áreas (A1, A2 e A3) as áreas ainda visivelmente saudáveis, apresentavam densidades bem menores quando comparadas aos corais controle. Já as partes necrosas e de bandas, apresentavam densidades semelhantes com demonstração de área realmente afetada.

A diferença entre as densidades de zooxantelas, assemelham-se a tecido de corais após terem passado por eventos de branqueamento (JONES, 1997), e influenciam diretamente na sua taxa de crescimento, seja do esqueleto, ou do tecido mole e causam a despigmentação dos corais (AL-HAMMADY, 2013), corroborando com a cor branca comumente encontrado entre bordas e no tecido em processo inicial de necrose, das duas doenças acompanhadas.

Diferente do que se observa no momento do branqueamento dos corais, em que ocorre a expulsão das zooxantelas, nos tecidos de corais doentes há a destruição de células e a consequente destruição das zooxantelas (CERVINO et al., 2004), corroborando com o que foi observado nas lâminas com a quebra das células e o extravazamento do material celular no meio.

Quanto às estruturas secretoras de muco, quando o coral apresenta respostas imunológicas, a quantidade de muco liberado é maior e a comunidade microbiana ao redor é diferenciada além de que se essa reação durante um período de tempo prolongado, o muco pode perder sua eficácia quanto as ações antibiótica (MAO-JONES et al., 2010; WRIGHT et al., 2019). Essa sobrecarga das estruturas produtoras de muco podem ser uma das explicações encontradas para o rompimento das células das estruturas, além do aumento anormal de todas como uma forma de reação imune à doença.

Além disso, a quantidade exagerada de muco liberado, quando em referência a composição de maioria de açúcares (LEE et al., 2016), responde o fato da rápida colonização por algas em corais com necrose inicial ou avançada.

É possível que as cianobactérias observadas possam fazer parte do mecanismo de fixação de nitrogênio nas células dos corais das espécie como já foi observado para *Montastrea cavernosa* (LESSER et al., 2008). Porém, essa hipótese perde forças quando o mesmo não se observou em todas as amostras, principalmente quando se comparadas as amostras dos dois locais de estudo.

Por outro lado, estudos como Frias-Lopes et al. (2003) nos faz pensar na relação das

cianobactérias encontradas em amostras de tecido de corais acometidos pela doença da praga branca, como a espécie *Phormidium corallytium* que acomete os corais e é o principal causador das características únicas da doença da banda negra, principalmente em *Faviidae*.

Para tal reconhecimento, aconselha-se a identificação por técnicas moleculares e morfológicas das espécies de cianobactérias amostradas nos tecidos. Em relação às diatomáceas, elas já são reconhecidas em muitas espécies vivendo em agregações dentro das células dos corais (AL-HANDAL; RIAUX-GOBIN, 2016) o que as tornam comum em todo o recife. Porém, a presença de diatomáceas em células de corais, reforça como um indicador o meio em que os corais estudados estão inseridos.

Em ambas áreas estudadas, o recife se mostra como uma alga-dominante e não coral-dominante. Nesses locais a presença e abundância das diatomáceas nas células dos corais demonstra como a entrada de nutrientes por meio de desague de rios e a introdução através do turismo pode estar sendo maléfica para as comunidades como um todo (LOBBAN et al., 2010).

Assim como a presença das diatomáceas, a presença de bactérias e fungos ser observadamente diferente quando comparadas entre as áreas estudadas (i. e. sendo observada somente nas amostras da praia do Seixas), pode ser a manifestação de um forte desequilíbrio e falta de manutenção correta do meio.

A presença de fungos e bactérias nas amostras de corais doentes, condizem com que se esperava, uma vez que a presença e abundância desses microorganismos já é anteriormente relatada como principais fatores do surgimentos das doenças e dos sintomas visíveis (WOODLEY, 2016).

A divisão visível entre as áreas no teste de agrupamento, demonstra a semelhança das amostras em área visivelmente saudável de um coral doente e o tecido de corais controle visivelmente saudável em sua totalidade, reforçando dessa forma, a segurança do método de amostragem (RAYMUNDO et al., 2008) e resultados reais em relação as semelhanças e diferenças observadas com os corais controle.

REFERÊNCIAS

- AEBY, Greta S. et al. Patterns of Coral Disease across the Hawaiian Archipelago: relating disease to environment. *Plos One*, v. 6, n. 5, p. 1-13. 2011.
- AINSWORTH, T. D.; KRAMASKY-WINTER, E.; LOYA, Y.; HOEGH-GULDBERG, O.; FINE, M. Coral Disease Diagnostics: what's between a plague and a band? What's between a Plague and a Band?. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 981-992. 2006
- AL-HAMMADY, Montaser Aly Mahmoud. The effect of zooxanthellae availability on the rates of skeletal growth in the Red Sea coral *Acropora hemprichii*. **The Egyptian Journal of Aquatic Research**, v. 39, n. 3, p. 177-183, 2013.
- AL-HANDAL, A; RIAUX-GOBIN, C. Marine benthic diatoms in the coral reefs of Reunion and Rodrigues Islands, West Indian Ocean 1. **Micronesica**. v. 3, n. 2016, p. 1-77. 2016.
- BYTHELL, J.c.; BARER, M.r.; COONEY, R.p.; GUEST, J.r.; O'DONNELL, A.g.; PANTOS, O.; TISSIER, M.d.a. Le. Histopathological methods for the investigation of microbial communities associated with disease lesions in reef corals. **Letters In Applied Microbiology**, v. 34, n. 5, p. 359-364. 2002.
- CERVINO, J. M. et al. Zooxanthellae Regulation in Yellow Blotch/Band and Other Coral Diseases Contrasted with Temperature Related Bleaching: In Situ Destruction vs Expulsion. **Symbiosis**, v. 37, n. 1, p. 63-85. 2004.
- COSTA, Cristiane F.; SASSI, Roberto; AMARAL, Fernanda D.. Population density and photosynthetic pigment content in symbiotic dinoflagellates in the Brazilian scleractinian coral *Montastrea cavernosa* (Linnaeus, 1767). **Brazilian Journal of Oceanography**, v. 52, n. 2, p. 93-99. 2004.
- EPSTEIN, Hannah E. et al. Temporal Variation in the Microbiome of *Acropora* Coral Species Does Not Reflect Seasonality. **Frontiers In Microbiology**, v. 10, p. 1-14. 2019.
- FRANCINI-FILHO, Ronaldo B. et al. Dynamics of Coral Reef Benthic Assemblages of the Abrolhos Bank, Eastern Brazil: inferences on natural and anthropogenic drivers. **Plos One**, v. 8, n. 1, p. 1-12. 2013.
- FRIAS-LOPEZ, Jorge; BONHEYO, George T.; JIN, Qusheng; FOUKE, Bruce W. Cyanobacteria Associated with Coral Black Band Disease in Caribbean and Indo-Pacific Reefs. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 69, n. 4, p. 2409-2413. 2003.
- JONES, Rj. Changes in zooxanthellae densities and chlorophyll concentrations in corals during and after a bleaching event. **Marine Ecology Progress Series**, v. 158, p. 51-59, 1997.
- KELLY, Lisa A. et al. Ecology and Pathology of Novel Plaque-Like Growth Anomalies Affecting a Reef-Building Coral on the Great Barrier Reef. **Frontiers In Marine Science**, v. 3, p. 1-12. 2016.
- LEÃO, Zelinda M. A. N. et al. Brazilian coral reefs in a period of global change: a synthesis.

Brazilian Journal Of Oceanography, v. 64, n. 2, p. 97-116. 2016.

LEE, Sonny T. M.; DAVY, Simon K.; TANG, Sen-lin; KENCH, Paul S. Mucus Sugar Content Shapes the Bacterial Community Structure in Thermally Stressed *Acropora muricata*. **Frontiers In Microbiology**, v. 7, p. 1-11. 2016.

LESSER, M. P. Discovery of Symbiotic Nitrogen-Fixing Cyanobacteria in Corals. **Science**, v. 305, n. 5686, p. 997-1000. 2004.

LOBBAN, C. S.; JORDAN, R. W.. Diatoms on coral reefs and in tropical marine lakes. **The Diatoms**, p. 346-356, 2010.

LIMA, Laís F. O. et al. Modeling of the Coral Microbiome: the influence of temperature and microbial network: the Influence of Temperature and Microbial Network. **mBio Mar** 2020, 11 (2) e02691-19.

LINS-DE-BARROS, M.; PIRES, D.; CASTRO, C.. (2003). Sexual Reproduction of the Brazilian Reef Coral *Siderastrea stellata* Verrill 1868 (anthozoa, Scleractinia). **Bulletin of Marine Science**, 73: 713-724.

LUNA, G. M.; BIAVASCO, F.; DANOVARO, R. Bacteria associated with the rapid tissue necrosis of stony corals. **Environmental Microbiology**, v. 9, n. 7, p. 1851-1857. 2007.

MAO-JONES, J.; RITCHIE, K.B.; JONES, L.E.; ELLNER, Stephen P. How Microbial Community Composition Regulates Coral Disease Development. **Plos Biology**, v. 8, n. 3, p. 45-61. 2010.

MENEZES, N.; NEVES, E.; KIKUCHI, R. K. P.; JOHNSON, R.. Morphological variation in the atlantic genus *Siderastrea* (Anthozoa, Scleractinia). **Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)**, [s.l.], p. 1-10, 2014. Universidade de Sao Paulo, Agencia USP de Gestao da Informacao Academica (AGUIA)

MILLER, J. et al. Coral disease following massive bleaching in 2005 causes 60% decline in coral cover on reefs in the US Virgin Islands. **Coral Reefs**, v. 28, n. 4, p. 925-937. 2009.

OSMAN, Eslam O. et al. Coral microbiome composition along the northern Red Sea suggests high plasticity of bacterial and specificity of endosymbiotic dinoflagellate communities. **Microbiome**, v. 8, n. 1, p. 1-7. 2020.

RAYMUNDO, L. J., COUCH, C. S. & HARVELL, C. D. (eds). 2008. Coral disease handbook: Guidelines for assessment, monitoring and management. Coral Reef Targeted Research and Capacity Building for Management Program. University of Queensland, Centre for Marine Studies, St Lucia QLD, Australia. 121 pp.

ST.GELAIS, Adam T.; CHAVES-FONNEGRA, Andia; MOULDING, Alison L.; 3KOSMYNIN, Vladimir N.; GILLIAM, David S. *Siderastrea siderea* spawning and oocyte resorption at high latitude. **Invertebrate Reproduction & Development**, v. 60, n. 3, p. 212-222. 2016.

TEDESCO, Erik C. et al. Conservation of Brazilian coral reefs in the Southwest Atlantic

Ocean: a change of approach. **Latin American Journal Of Aquatic Research**, v. 45, n. 2, p. 228-245. 2017

WOODLEY, C. M., DOWNS, C. A., BRUCKNER, A. W., PORTER, J. W. & GALLOWAY, S. B. 2016. *Disease of Coral*. New Jersey: Wiley Blackwell, 582 pp.

WRIGHT, Rachel M.; STRADER, Marie E.; GENUISE, Heather M.; MATZ, Mikhail. Effects of thermal stress on amount, composition, and antibacterial properties of coral mucus. **Peerj**, v. 7, p. 1-26. 2019.