

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG
INSTITUTO DE OCEANOGRAFIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA

**MÚLTIPLOS ESTRESSORES EM RECIFES DE CORAL:
RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE ORGANISMOS
CALCIFICADORES**

JOSEANE APARECIDA MARQUES

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande - FURG, como requisito parcial à obtenção do título de DOUTORA.

Orientador: Prof. Dr. Adalto Bianchini

RIO GRANDE

Março de 2019

À minha família

Deus ao mar o perigo e o abismo deu, mas nele é que espelhou o céu.

Fernando Pessoa

The sea, once it casts its spell, holds one in its net of wonder forever.

Jacques-Yves Cousteau

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha mãe, irmãs e tios, por todo o suporte, incentivo, amor e compreensão. Amo vocês!

Agradeço ao meu orientador, Dr. Adalto Bianchini, pela confiança e por todas as oportunidades de crescimento profissional que me proporcionou.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica (Instituto de Oceanografia - FURG) pela concessão da bolsa de doutorado (Programa de Excelencia Acadêmica - PROEX)

Agradeço à Rede de Pesquisas Coral Vivo/Projeto Coral Vivo e seus patrocinadores, Programa Petrobras Ambiental e Arraial d'Ajuda Ecoparque, pela infraestrutura e apoio logístico oferecidos para a realização de coletas e experimentos.

Ao programa Ciências do Mar II – CAPES, pela concessão da bolsa de doutorado-sanduiche realizado no Instituto Australiano de Ciências Marinhas (AIMS).

Agradeço aos financiadores da minha pesquisa, Programa Ciências do Mar II - CAPES, CNPq, INCT-Toxicologia Aquática, *The International Development Research Centre* (IDRC) Canada, Associação Internacional do Cobre, *Cushman Foundation for Foraminiferal Research* e *Australian Government's National Environmental Science Programme* (NESP).

Não se faz ciência sozinho, e nesse sentido agradeço imensamente aos colegas de trabalho que me ensinaram ou ajudaram em campo ou laboratório. Em especial, aos parceiros de mesocosmo Laura Marangoni, Cristiano Pereira, Douglas Abrantes, Emiliano Calderon, Amana Garrido, Laís Fonseca, Ellie Bergstrom, professores Clovis Castro e Debora Pires, e aos funcionários e estagiários do Coral Vivo, um grande abraço e muito obrigada pela parceria e excelente trabalho em equipe.

Também reservo agradecimentos mais que especiais para minha amiga, quase irmã, colaboradora científica, parceira de mesocosmo e de laboratório Laura Marangoni.

Agradeço ao Dr. Andrew Negri e ao Dr. Sven Uthicke pela orientação e colaboração durante o período de doutorado sanduiche no AIMS (*Australian Institute of Marine Science*).

Many thanks to Florita Flores, Dr. Sven Uthicke, Dr. Andrew Negri and Frances Patel for receiving me so well. Thanks to Dr. Joy Smith, Sam Noonan, Stephanie di Perna and Dr. Laura Richardson for the help with field work at Orpheus Island, and to SeaSim staff and Emma Marangon for the help with forams sorting and with my experiments. Cheers to all of my Townsville friends for making my Australian adventure much easier.

Aos colegas do grupo de pesquisa (Bianchetes) pelos treinamentos e discussões sobre ciência e sobre os desafios da pesquisa.

Em especial, agradeço à Dr. Patricia Costa pela colaboração e dedicação para a análise de contaminantes, e aos alunos de Iniciação Científica que auxiliaram no processo e facilitaram nossa vida.

Agradeço a todos os professores e pesquisadores do Centro de Estudos do Mar (UFPR), da FURG, da Rede de Pesquisas Coral Vivo, do AIMS e do “Anexo 1” que auxiliaram na minha formação, e que continuam a me inspirar a seguir a carreira de cientista do mar.

Aos membros da banca, Dr. Paulo da Cunha Lana (meu primeiro mentor científico!), Dra. Marta Marques, Dra. Clarisse Odebrecht e Dr. Alexandre Garcia, por se disponibilizarem para ler e contribuir com meu trabalho.

Aos funcionários e alunos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB - FURG).

Em especial, um grande abraço e agradecimento à Inês – guardiã da fisiologia, organizadora de nossas sessões terapêuticas, e ótima companheira em dias de dupla jornada.

Ao pessoal da “salinha 2”, pelas risadas, doces, mates, terapia grupal, e consolo em meio ao caos da pós-graduação.

Às minhas amigas de infância, por manterem nosso laço acolhedor e por me incentivarem mesmo com a longa distância.

Aos inúmeros amigos que a oceanografia me deu, e que mesmo (literalmente) espalhados pelo mundo se fizeram presentes com sugestões, conselhos, apoio e incentivo.

E aos muitos amigos que fizeram da minha vida no extremo sul um pouco mais calorosa. Viver longe da família não é fácil, mas dividir esse peso com vocês me trouxe inúmeros momentos felizes e me permitiram me sentir “em casa”. O suporte de vocês me ajudou a entender a poesia de Albert Camus: "Na profundidade do inverno, finalmente aprendi que dentro de mim havia um verão invencível."

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para minha formação profissional e para a concretização dos trabalhos desta tese.

Prefácio

Esta tese faz parte dos requisitos obrigatórios para a obtenção do doutorado no Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica da Universidade Federal do Rio Grande, Brasil.

Na Introdução Geral, aborda-se os temas relacionados à tese, e são apresentadas as hipóteses e objetivos específicos do trabalho. Na seção Material e Métodos, são descritos de forma resumida e em linhas gerais os principais métodos utilizados em cada capítulo da tese. Em seguida, uma síntese dos resultados encontrados são descritos e discutidos em linhas gerais. Por fim, são apresentadas as conclusões gerais da tese.

Quatro capítulos independentes são então apresentados em forma de anexos. No primeiro documento (Anexo I), é apresentado um capítulo de livro intitulado “Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral”. Este capítulo foi publicado no livro “Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo”. Um dos principais objetivos do capítulo e do livro do qual faz parte é fornecer textos base sobre os recifes de coral, que estejam redigidos em português e em linguagem acessível para graduandos, e também para o público leigo em geral.

Os capítulos seguintes (Anexos II, III e IV) são apresentados em forma de manuscrito ou artigo científico na língua inglesa. No Anexo II, em artigo publicado no periódico *Science of The Total Environment*, foi avaliado o efeito de múltiplos contaminantes na qualidade ambiental de determinados recifes de coral da costa brasileira usando indicadores ecológicos, geoquímicos e de qualidade da água. No Anexo III, em manuscrito submetido para o periódico *Environmental Research*, o efeito combinado de mudanças climáticas e contaminação por cobre foi avaliado em uma espécie de foraminífero com endossimbionte. No Anexo IV, um manuscrito em preparação avalia o efeito de mudanças climáticas e da contaminação pelo herbicida diuron na ecofisiologia de uma espécie de alga calcária, através de parceria com o Instituto Australiano de Ciências Marinhas (Australian Institute of Marine Science – AIMS) durante período de doutorado-sanduíche.

ÍNDICE

Dedicatória.....	II
Epígrafe	III
Agradecimentos	IV
Prefácio	VI
Resumo	9
Abstract.....	10
1. Introdução Geral	11
1.1. Múltiplos estressores e recifes de coral	11
1.2. Espécies bioindicadoras	14
1.3. Efeitos biológicos	16
2. Objetivo geral e Hipóteses de trabalho.....	19
3. Objetivos específicos.....	20
4. Material e Métodos.....	21
4.1. Síntese material e métodos - Anexo I: Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral.....	21
4.2. Síntese material e métodos - Anexo II: Qualidade ambiental em recifes de coral do Atlântico Sudoeste: indicadores geoquímicos, de qualidade da água e ecológicos.....	22
4.3. Síntese material e métodos - Anexo III: O cobre reduz a tolerância do foraminífero com endossimbionte <i>Amphistegina gibbosa</i> às mudanças climáticas.....	28
4.4. Síntese material e métodos - Anexo IV: Impacto cumulativo de mudanças climáticas e do herbicida diuron na ecofisiologia da alga calcária <i>Halimeda opuntia</i>.....	32
5. Resultados e Discussão	37
5.1. Síntese Anexo I: Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral.....	37
5.2. Síntese Anexo II: Qualidade ambiental em recifes de coral do Atlântico Sudoeste: indicadores geoquímicos, de qualidade da água e ecológicos	37
5.3. Síntese Anexo III: O cobre reduz a tolerância do foraminífero com endossimbionte <i>Amphistegina gibbosa</i> às mudanças climáticas.....	39
5.4. Síntese Anexo IV: Impacto cumulativo de mudanças climáticas e do herbicida diuron na ecofisiologia da alga calcária <i>Halimeda opuntia</i>.....	40
5.5. Discussão geral.....	41
6. Conclusões	44
7. Referências bibliográficas.....	45

8. ANEXOS	60
8.1. Anexo I. BIOINDICADORES E BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS EM RECIFES DE CORAL.....	60
8.2. Anexo II. QUALIDADE AMBIENTAL EM RECIFES DE CORAL DO ATLÂNTICO SUDOESTE: INDICADORES GEOQUÍMICOS, DE QUALIDADE DA ÁGUA E ECOLÓGICOS.	73

Resumo

Recifes de coral estão expostos a diversos estressores, incluindo a poluição e as mudanças climáticas. O presente estudo tem como objetivo geral avaliar a influência de múltiplos estressores antrópicos na ecofisiologia de espécies fototróficas calcificadoras de recifes de coral. A ocorrência e efeito de estressores locais foram avaliados em recifes brasileiros, através de um estudo de caso na costa de Porto Seguro (BA). Por sua vez, o efeito de estressores globais (aquecimento e acidificação da água do mar) combinados ou não a estressores locais (contaminação por cobre ou pelo herbicida diuron) foram avaliados experimentalmente no foraminífero com endossimbionte *Amphistegina gibbosa* e na alga calcária *Halimeda opuntia*. Indicadores geoquímicos e de qualidade da água mostraram que recifes próximos à costa sul da Bahia (Brasil) experimentam enriquecimento por nitrogênio, contaminação por esgoto e concentrações de metais acima das diretrizes internacionais de qualidade ambiental. Níveis mais altos de contaminação foram fortemente relacionados à maior frequência de branqueamento e menor densidade em populações de *A. gibbosa*. Efeitos biológicos relevantes foram observados em uma espécie bioindicadora clássica de ambientes recifais, apontando o risco que poluentes derivados do continente representa para os recifes de coral brasileiros. Ao investigar o efeito combinado de estressores globais e contaminação por cobre em *A. gibbosa*, encontrou-se alterações fisiológicas e bioquímicas que indicam comprometimento geral da saúde organismal. Nossos resultados aumentam a compreensão da ecofisiologia dos foraminíferos e fornecem informações para o manejo de recifes de corais, detectando potenciais ferramentas de monitoramento. Efeitos de herbicidas e de uma aclimação a longo prazo a mudanças climáticas foram avaliados para *Halimeda* spp. pela primeira vez. A co-exposição a estressores globais e ao diuron levou a menores taxas de calcificação e fotossíntese, a uma indução do sistema antioxidante e à inibição de enzimas relacionadas à calcificação. A contaminação reduz a tolerância de espécies calcificadoras às mudanças climáticas, destacando a necessidade de diretrizes de qualidade da água ajustadas ao clima. Esses resultados evidenciam o alto risco que a combinação de mudanças climáticas e poluição representa para o ecossistema de recifes de coral.

Palavras-chave: Mudanças climáticas, Metais, Herbicidas, Foraminífero com endossimbionte, Alga calcária, Biomarcadores

Abstract

Coral reefs are exposed to multiple stressors, including pollution and climate change. This thesis aims to evaluate the influence of multiple anthropic stressors on the ecophysiology of coral reef calcifying phototrophic species. The occurrence and ecophysiological effects of multiple local stressors, mainly contaminants, were evaluated using a case study on reefs of Porto Seguro (BA, Brazil). The effects of global stressors (ocean warming and acidification) combined or not with local stressors (contamination by copper or by the herbicide diuron) were evaluated experimentally using the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina gibbosa* and the calcifying algae *Halimeda opuntia* as bioindicators. Geochemical and water quality indicators showed that reefs close to Bahia coast (Brazil) experience nutrient enrichment and sewage contamination, as well as metals above international environmental quality guidelines. Higher levels of contamination were strongly related to the higher frequency of bleaching and lower density in *A. gibbosa* populations. Relevant biological effects were observed in a classical bioindicator species of reef systems, pointing out the risk that land-based contaminants pose for Brazilian coral reefs. Investigating the combined effect of global stressors (ocean warming and acidification) and copper contamination on *A. gibbosa*, we found physiological and biochemical alterations indicating overall organismal health impairment. Our results increase the understanding about foraminifera ecophysiology and provide information for coral reef management by detecting potential monitoring tools. The co-exposure to ocean warming, acidification and diuron contamination on *H. opuntia* led to lower rates of calcification and photosynthesis, an induction of the antioxidant system and the inhibition of calcification-related enzymes. Contamination reduces tolerance of calcifying phototrophic species to climate change, highlighting the need for climate-adjusted water quality guidelines. Considering that the analysed biomarkers have high ecological relevance, and also that the responses were evaluated in key bioindicator species for reef systems, these results highlight the high risk of the combination of climate change and pollution in the coral reef ecosystem.

Key-words: Climate change, Metals, Herbicides, Symbiont-bearing foraminifera, Calcifying algae, Biomarkers

1. Introdução Geral

1.1. Múltiplos estressores e recifes de coral

Recifes de coral estão expostos a estressores naturais, como por exemplo a variação da salinidade e a ocorrência de ciclones, e estressores antrópicos, como a contaminação e a sobrepesca (Ban et al., 2014). A qualidade ambiental desse e outros ecossistemas marinhos está ameaçada pela ocorrência simultânea de múltiplos estressores antrópicos que podem ocorrer em escala espacial local ou global (Halpern et al., 2015; Elliff & Kikuchi, 2017).

Dentre os estressores de escala local que afetam recifes de coral, destaca-se o aporte de sedimento, nutrientes e contaminantes. O aporte de material continental associado ao escoamento superficial e principalmente a plumas de rios é um dos principais veículos de contaminantes, excesso de nutrientes e de sedimento terrígeno para recifes (Fabricius 2005). Este processo, denominado genericamente como “runoff”, transporta uma ampla gama de substâncias derivadas do continente, podendo degradar a qualidade da água em escala local (Fabricius et al., 2013; Fabricius et al., 2014). Sua ocorrência está relacionada a características geológicas, hidrológicas e oceanográficas locais, e seu fluxo aumenta em função do deflorestamento, ocupação urbana desordenada, e em função de alterações climáticas que afetem a pluviosidade. Os efeitos do “runoff” se tornaram uma considerável preocupação para a conservação dos recifes de coral, especialmente pela emblemática ocorrência desses ecossistemas em águas oligotróficas e de baixo aporte de sedimento terrígeno (Fabricius et al. 2013; Zilberberg et al., 2016).

Destacam-se aqui os metais e os pesticidas dentre os contaminantes que podem ser carregados pelo “runoff” até os recifes. Diversos metais são usados na fabricação de tintas anti-incrustantes e de alguns herbicidas (van Dam et al., 2011). Ainda, a presença de metais em corpos d’água também está fortemente associada ao esgoto doméstico e industrial (Furness & Rainbow, 1990; Jones, 2010; Machado et al., 2016). Fertilizantes e pesticidas derivados de atividades agrícolas são frequentemente transportados por plumas de rios para ambientes recifais, causando diversos efeitos deletérios para a biota (Lewis et al., 2009; Lewis et al., 2012; Negri et al., 2015; Mercurio et al., 2018).

Os recifes de coral tropicais estão entre os ecossistemas marinhos mais estudados dentro do contexto de múltiplos estressores. São ambientes de alta produtividade, e devido a sua característica estrutura tridimensional, construída principalmente por organismos calcificadores, fornece uma grande variedade de microhabitats e sustenta uma rica biodiversidade (Moberg & Folke, 1999; Zilberberg et al., 2016; Tkachenko, 2017). Os recifes de coral são ecossistemas de notável valor socioeconômico, provendo serviços ecológicos e de subsistência para milhões de pessoas (Costanza et al., 1997; Moberg and Folke, 1999; Veron et al., 2009; Zilberberg et al., 2016; Elliff & Kikuchi, 2017;).

No Brasil, particularmente, pelo menos 40% dos recifes encontram-se ameaçados por pressões antrópicas (Rodríguez-Ramírez et al., 2008; Magris et al., 2018). Contudo, são poucas as informações acerca da ocorrência e níveis de contaminantes nos recifes brasileiros. Não obstante os ecossistemas estuarinos da costa do Brasil, por exemplo, são amplamente estudados sob tal prisma toxicológico. Logo, um melhor conhecimento sobre os principais contaminantes ocorrendo em ambientes recifais brasileiros e sobre seus efeitos ecofisiológicos é fundamental para determinar medidas adequadas de manejo.

Vários estudos têm alertado também sobre as ameaças que estressores relacionados às mudanças climáticas (como o aumento da temperatura e a acidificação dos oceanos) representam para os ecossistemas marinhos (Boyd et al., 2018). Além disso, as possíveis interações com estressores locais (i.e. contaminantes) podem amplificar os efeitos deletérios da exposição a estressores climáticos globais.

Sabe-se que os recifes de coral tropicais são sensíveis aos efeitos de mudanças climáticas e processos associados (Ban et al., 2014). Muitas espécies recifais experimentam naturalmente seu limite superior de temperatura, sendo, portanto, fortemente afetadas por anomalias térmicas (Fitt et al., 2001; Lough et al., 2018). Como exemplo, citamos o estresse térmico de eventos *El Niño* que causam branqueamento e mortalidade em massa em espécies de coral (Claar et al., 2018; Lough et al. 2018).

A acidificação marinha induzida pela absorção oceânica de CO_2 é particularmente prejudicial a organismos calcificadores (Hoegh-Guldberg et al., 2007). Esse processo altera propriedades físico-químicas da água, reduzindo os estados de saturação de calcita e aragonita, alterando o equilíbrio dinâmico dos carbonatos, e levam a um maior gasto energético para manutenção do equilíbrio ácido-base celular (Pörtner et al., 2004). A alteração da disponibilidade de íons carbonato (CO_3^{2-}) pode reduzir a produção do

carbonato de cálcio (CaCO_3), e aumentar as taxas de dissolução de esqueletos (Andersson & Gledhill, 2013). A maioria das espécies-chave deste ecossistema (por exemplo, corais escleractíneos e algas calcárias) são calcificadoras e atuam na construção da estrutura tridimensional do recife. Logo, se a formação e manutenção da estrutura física dos recifes é dependente de organismos calcificadores, então o processo de acidificação pode ter efeitos negativos no ecossistema recifal como um todo.

Muitos estudos avaliaram os efeitos ecofisiológicos do aquecimento ou da acidificação marinha na biota de recifes de coral (Vogel et al., 2015b; Scherner et al., 2016; Fonseca et al., 2017; Stuhr et al., 2017). No entanto, previsões feitas pelo Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC) apontam a ocorrência simultânea de aquecimento e acidificação nos oceanos (Schmidt et al., 2014; Campbell et al., 2016; Bergstrom et al., 2019). Portanto, é de extrema importância que futuros estudos experimentais considerem o efeito combinado desses estressores globais (Schmidt et al., 2014).

Quando estressores diferentes ocorrem coincidindo no tempo e no espaço, além do “simples” acúmulo ou soma de efeitos (efeitos cumulativos), vários tipos de interações podem ocorrer (efeitos interativos). É importante saber se um estressor amplifica/piora (sinergismo) ou atenua/reduz (antagonismo) os efeitos de outro estressor (Crain et al., 2008). A presença de estressores locais pode exercer pressão adicional sobre os organismos recifais, comprometendo sua resiliência diante de mudanças ambientais globais. Essas podem, por sua vez, amplificar a toxicidade de poluentes (Noyes et al., 2009; Roberts et al., 2013). Como consequência, limites de toxicidade para determinados contaminantes podem precisar ser revisados. Neste contexto, uma corrente atual chama a atenção para a necessidade de se adaptar Diretrizes de Qualidade da Água através da determinação de “climate adjusted thresholds”, ou seja, concentrações máximas permitidas ou concentrações limites de contaminantes ajustadas em função de mudanças climáticas (Uthicke et al., 2016).

Segue, assim, que melhorar a qualidade ambiental é crucial à saúde dos recifes de coral, o que pode contribuir para a resiliência do recife contra anomalias térmicas e diante da maior frequência de tempestades e outros estressores globais (Brown et al., 2013; Ban et al., 2014). No panorama da simultaneidade entre mudanças climáticas e contaminação

em muitos recifes, a compreensão de efeitos combinados em espécies chave de recifes de coral é imperativa para o manejo e conservação de ecossistemas.

1.2. Espécies bioindicadoras

Os recifes de coral são formados principalmente por organismos calcificadores (secretam esqueleto de carbonato de cálcio) fototróficos (utilizam a luz como fonte de energia primária), os quais contribuem para a formação de um habitat estrutural complexo, tridimensional e biodiverso (Veron 2011; Zilberberg et al. 2016). De forma geral, estressores que causam impacto na fotossíntese e na calcificação de espécies chave de recifes de coral (e.g. corais e algas calcárias), tem grande potencial para causar impactos em nível ecossistêmico.

Considerando o exposto, e também considerando lacunas de conhecimento sobre efeitos de múltiplos estressores em determinadas espécies, nesta tese destacam-se dois organismos calcificadores e fototróficos: o foraminífero com endossimbionte *Amphistegina gibbosa* e a alga calcária *Halimeda opuntia* (Figura 1).

Foraminíferos são protistas caracterizados pela presença de pseudópodes granuloreticulados envoltos por uma testa (concha externa), a qual pode ser composta por material orgânico ou por carbonato de cálcio (CaCO_3). Um grupo de foraminíferos conhecido como *Larger Benthic Foraminifera* (LBF), caracterizado por possuir microalgas endossimbiontes e por atingir tamanhos relativamente grandes, é um importante produtor de sedimento carbonático, podendo ser responsável por 2,5-90% da produção de CaCO_3 em ambientes recifais (Langer 2008). Os LBF possuem requerimentos fisiológicos semelhantes aos corais escleractínios zooxantelados, pelo fato de realizarem simbiose com microalgas, sofrerem eventos de branqueamento em condições estressantes e possuírem esqueleto calcário. Em contrapartida, possuem um ciclo de vida curto (3-12 meses), respondendo rapidamente a mudanças ambientais (Hallock et al., 2003). Essas características tornaram os foraminíferos, especialmente os LBF, bioindicadores de alterações na qualidade ambiental de recifes de coral (Hallock et al. 2003; Hallock et al., 2006; Cooper et al., 2009).

O gênero *Amphistegina* (Figura 1) é um dos LBF mais frequentes e abundantes em recifes de todo o mundo. Possuem diatomáceas endossimbiontes e hábito epibionte

(organismo que vive sobre outro ser vivo) podendo ser encontrados em substratos como esqueletos de corais e macroalgas. Espécimes de *Amphistegina* são relativamente de fácil coleta e cultivo, e respondem visualmente diante de mudanças ambientais por meio de alterações na sua coloração, motilidade e estrutura da concha. É, portanto, um dos gêneros de foraminífero mais utilizado em ensaios laboratoriais e no monitoramento ambiental de recifes (Hallock et al., 2006; Prazeres et al., 2012; Ross & Hallock, 2014).

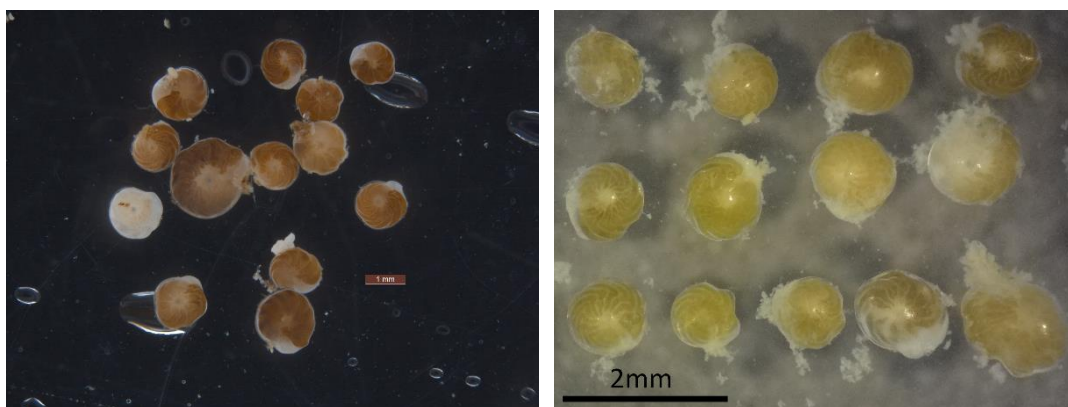


Figura 1. Fotografias de indivíduos de (a) *Amphistegina lobifera* e (b) *Amphistegina gibbosa*. Fonte: Joseane A Marques

Por sua vez, macroalgas bentônicas desempenham funções chave nos ecossistemas marinhos, fornecendo alimento e abrigo. Devido ao seu hábito bentônico, ampla distribuição geográfica, e papel chave na teia trófica e em fluxos de carbono de vários ambientes, tem sido utilizadas como bioindicadoras de alterações ambientais (Horta et al., 2016). Além disso, vale ressaltar que algas calcárias, em especial, ocorrem em todos os oceanos e representam uma considerável parte da biomassa de recifes de coral (Figueiredo, 2000).

A capacidade de deposição extracelular de carbonato de cálcio ocorre em macroalgas marrons, vermelhas e verdes. Entre as algas verdes (Chlorophyta), algumas espécies das classes Ulvophyceae e Bryosidophyceae são calcificadoras e tropicais. Algas calcárias são componentes chave em recife de coral tropicais, construindo ou reforçando a estrutura tridimensional dos recifes, e sendo por isso consideradas importantes organismos construtores. No Arquipélado de Abrolhos, por exemplo, algas calcificadoras

representam de 30 a 50% da cobertura recifal, enquanto no Atol das Rocas chegam a representar 60% (Castro & Pires, 2001; Bôas et al., 2005).

Algas verdes calcárias (ordem Chlorophyta) do gênero *Halimeda* (Figura 2) são abundantes em ambientes tropicais de águas rasas (Verbruggen et al., 2006). São macroalgas ecologicamente importantes, considerando sua alta contribuição para a produtividade primária, a produção de carbonato e por fornecer habitat para múltiplos organismos (Hillis-Colinvaux 1980; Rees et al., 2007). Devido ao seu papel fundamental na estrutura e construção de recifes, os efeitos de múltiplos estressores em *Halimeda* têm sido amplamente estudados (Hofmann et al., 2014; Meyer et al., 2015; Vogel et al., 2015a; Campbell et al. 2016; Bergstrom et al. 2019).



Figura 2. Fragmentos de *Halimeda opuntia* (a) fotografados em mapa/diagrama de escala de cor internacional conhecido como "Coral Health Watch"; (b) dentro da câmara experimental. Fonte: Joseane A Marques

1.3. Efeitos biológicos

Para avaliar a ocorrência e magnitude do impacto de estressores antrópicos, são necessárias a detecção e quantificação dos seus efeitos biológicos. Respostas biológicas a uma condição ambiental alterada (i.e. aumento anômalo na temperatura) podem ocorrer em diversos níveis de organização biológica, do subcelular com alteração nos níveis de

expressão gênica e na cinética enzimática, até os níveis organizmico, populacional e ecossistêmico.

Existe uma hierarquia nessa organização, sendo que o nível de complexidade e de relevância ecológica aumenta com os níveis de organização biológica (Figura 3). Os impactos da alteração ambiental são exercidos primeiramente no nível gênico, molecular e celular, influenciando processos bioquímicos e fisiológicos, os quais impactam o metabolismo e desempenho fisiológico do organismo. Isso tem efeitos sobre processos fisiológicos vitais como crescimento e reprodução, podendo afetar a dinâmica populacional e padrões de abundância. Tais impactos sobre as populações influenciam a composição e biodiversidade das comunidades, e podem culminar em alterações na escala ecossistêmica (Moore et al., 2004).

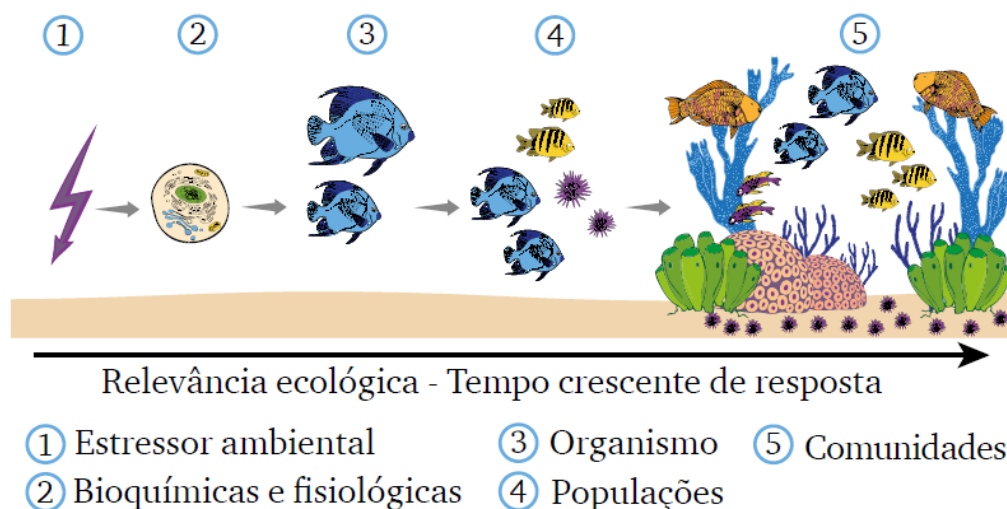


Figura 3. Ilustração esquemática dos diferentes níveis de organização biológica (diferentes números), e o crescente grau de relevância ecológica e tempo de detecção de resposta em função da exposição a estressores ambientais. Fonte: Marques et al., 2016.

Desse variado espectro de respostas, com diferentes tempos de detecção e complexidade, segue a aplicação e uso de biomarcadores. Biomarcadores são

conceiturados como alterações biológicas em nível molecular, celular, fisiológico e/ou comportamental que expressam a exposição e os efeitos induzidos por contaminantes ou condições ambientais alteradas (Downs et al., 2000; Moore et al., 2004; Baird et al., 2007; Zilberberg et al. 2016)

Biomarcadores bioquímicos são amplamente utilizados como ferramentas de aviso prévio, uma vez que detectam estresse em escalas subcelulares antes mesmo que efeitos de letalidade, ou mesmo visuais (e.g. branqueamento), sejam manifestados (Depledge et al., 1995; Moore et al. 2004; Downs et al., 2005; Monserrat et al., 2007; Pérez-Ruzafa et al., 2018). Seu uso como ferramenta de monitoramento ambiental em recifes de coral tem se consolidado (Downs et al. 2002; Downs et al. 2005; Prazeres et al., 2012; Fragoso dos Santos et al., 2015; Zilberberg et al. 2016; Marques et al., 2017). Já no nível orgânico, parâmetros fisiológicos como crescimento, respiração e fotossíntese são ecologicamente relevantes e podem ser ligados a efeitos populacionais mais facilmente (em comparação com os biomarcadores bioquímicos) (Baird et al. 2007).

A utilização de biomarcadores de vários níveis de organização biológica permite uma melhor compreensão sobre os mecanismos de resposta ao estresse ambiental. Além disso, a integração da resposta de múltiplos biomarcadores permite uma avaliação holística da saúde do organismo, resultando em indicadores matemáticos de estresse, os quais podem ser úteis para o gerenciamento costeiro.

Tendo em vista o grande valor ecológico e econômico dos recifes de coral é de extrema importância que sejam identificadas ferramentas a serem utilizadas em programas de monitoramento. A ocorrência, concentração e os efeitos de contaminantes são pouco estudados nos recifes do Atlântico Sul.

Além disso, considerando que os oceanos estão enfrentando pressões de um mundo em transformação, conhecer o efeito combinado da contaminação ambiental e de cenários de mudanças climáticas em espécies indicadoras é crucial para determinar medidas de manejo. Por fim, identificar os biomarcadores mais adequados para monitorar os efeitos desses estressores é de fundamental importância para definir estratégias de avaliação e monitoramento da saúde dos recifes de coral.

2. Objetivo geral e Hipóteses de trabalho

O objetivo geral desta tese foi o de avaliar a influência de múltiplos estressores antrópicos, de escalas local e global, na ecofisiologia de espécies fototróficas calcificadoras de recifes de coral.

Para isto, os efeitos de múltiplos estressores antrópicos locais foram avaliados através de um estudo de caso em recifes da região costeira de Porto Seguro (BA, Brasil). Por sua vez, os efeitos de estressores globais (aquecimento e acidificação da água do mar) combinados ou não a estressores locais (contaminação por cobre ou pelo herbicida diuron) foram avaliados experimentalmente utilizando-se o foraminífero *Amphistegina gibbosa* e a alga calcária *Halimeda opuntia* como bioindicadores.

Com base nestes estudos, testaram-se as seguintes hipóteses de trabalho:

- (i) Se existe um gradiente de influência antrópica entre recifes de coral próximos à costa e recifes mais distantes da costa, na região de Porto Seguro (BA), então a concentração de metais, esteróis fecais e o enriquecimento de nitrogênio apresentarão correlação inversa com a distância da costa;
- (ii) Se há efeitos biológicos decorrentes do gradiente de influência antrópica, então marcadores abióticos de estresse ambiental estarão relacionados a menores densidades de *A. gibbosa* e maior frequência de branqueamento;
- (iii) Se o aumento da temperatura, acidificação marinha e contaminação por cobre afetam significativamente a ecofisiologia de *A. gibbosa*, então espera-se encontrar alterações em biomarcadores bioquímicos e fisiológicos maiores em organismos expostos a esses estressores do que em organismos expostos apenas a variação natural da condição ambiente;
- (iv) a exposição ao cobre intensifica os efeitos deletérios causados pelo aumento da temperatura e acidificação marinha em *A. gibbosa*;

- (v) Se biomarcadores bioquímicos e fisiológicos na alga calcária *H. opuntia* são alterados por cenários de mudanças climáticas previstos pelo IPCC e contaminação pelo herbicida diuron, então espera-se que esses parâmetros variem mais em organismos expostos a esses estressores do que em organismos mantidos apenas na condição ambiente;
- (vi) a exposição ao diuron intensifica os efeitos deletérios causados pelos cenários de mudanças climáticas em *H. opuntia*.

3. Objetivos específicos

- (i) Determinar a concentração dos metais cobre, zinco, chumbo e cádmio em amostras de água coletadas ao longo de um suposto gradiente de influência antrópica na região costeira de Porto Seguro (BA).
- (ii) Determinar isótopos estáveis de carbono ($\delta^{13}\text{C}$) e nitrogênio ($\delta^{15}\text{N}$), bem como a concentração de marcadores geoquímicos de esgoto doméstico ao longo de um suposto gradiente de influência antrópica na região costeira de Porto Seguro (BA).
- (iii) Avaliar a resposta de biomarcadores ecológicos (densidade populacional), fisiológicos (branqueamento) e bioquímicos (concentração de clorofila α) no foraminífero com endossimbionte *A. gibbosa* coletado em diferentes pontos ao longo de um suposto gradiente de influência antrópica na região costeira de Porto Seguro (BA).
- (iv) Avaliar a resposta de biomarcadores bioquímicos (atividade da Ca^{2+} -ATPase, H^{+} -ATPase, e concentração de clorofila α) em *A. gibbosa* exposto ao aumento de temperatura e acidificação marinha, combinados ou não com exposição ao cobre, em mesocosmo marinho.
- (v) Avaliar a resposta de biomarcadores fisiológicos (mortalidade, branqueamento, respiração, e crescimento) em *A. gibbosa* exposto ao aumento de temperatura e acidificação marinha, combinados ou não com exposição ao cobre.
- (vi) Avaliar a resposta de biomarcadores bioquímicos (capacidade antioxidante total, lipoperoxidação, atividade da Ca^{2+} -ATPase, atividade da anidrase carbonica) na

alga calcária *H. opuntia* exposta ao aumento de temperatura e acidificação marinha, combinados ou não com exposição ao diuron.

- (vii) Avaliar a resposta de biomarcadores fisiológicos (capacidade fotoquímica, respiração, produção de oxigênio e taxa de calcificação) em *H. opuntia* exposta ao aumento de temperatura e acidificação marinha, combinados ou não com exposição ao diuron.
- (viii) Sugerir biomarcadores com potencial para serem utilizados como ferramentas alternativas e complementares ao monitoramento dos efeitos biológicos da contaminação ambiental e das mudanças climáticas em recifes de coral.

4. Material e Métodos

4.1. Síntese material e métodos - Anexo I: Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral

O primeiro anexo a fazer parte desta tese teve como objetivo revisar e descrever, resumidamente, os estressores mais comumente relacionados a impactos antrópicos em recifes de coral, assim como algumas das ferramentas de avaliação e monitoramento ambiental mais usadas. As informações foram reunidas a partir de pesquisas realizadas em livros relacionados a ecotoxicologia e/ou recifes de coral, em relatórios técnicos, em plataformas de periódicos científicos (como exemplo, Science Direct, Periódicos CAPES, Research Gate), em páginas oficiais relacionadas a monitoramento ambiental de diversos países, com foco para o Brasil (principalmente informações contidas nas plataformas online do IBAMA e do ICMBio), Estados Unidos (principalmente informações integradas na plataforma online do programa NOAA Coral Reef Watch, *National Oceanic and Atmospheric Administration*) e Austrália (principalmente informações e relatórios técnicos reunidos na plataforma e banco de dados do AIMS, *Australian Institute of Marine Science*).

Essa revisão foi publicada em um capítulo de livro de divulgação científica, que tem como público alvo estudantes de ensino médio e graduação. Considerando que a maior parte da literatura especializada se encontra escrita na língua inglesa, esse livro foi

idealizado para tornar mais acessível o conhecimento sobre o ecossistema recifal, as particularidades dos recifes brasileiros e os projetos vinculados à Rede de Pesquisas Coral Vivo.

4.2. Síntese material e métodos - Anexo II: **Qualidade ambiental em recifes de coral do Atlântico Sudoeste: indicadores geoquímicos, de qualidade da água e ecológicos**

4.2.1. Área de Estudo

No Brasil, recifes de coral tropicais de águas rasas ocorrem desde a foz do rio Amazonas até o estado de São Paulo. O maior complexo recifal do Atlântico Sul está localizado no estado da Bahia, nordeste brasileiro. De forma geral, diversos recifes rasos ocorrem ao longo costa sul da Bahia, incluindo a cidade de Porto Seguro (Castro & Pires, 2001; Zilberberg et al., 2016; Pereira-Filho et al., 2019).

O Parque Natural Municipal do Recife de Fora (PNMRF) é uma unidade de conservação localizada a 8 km de Porto Seguro, BA. Sua área engloba um complexo recifal (aproximadamente 17,5 km² de área), denominado Recife de Fora, e diversos fragmentos de recife (Sena et al., 2006; Seoane et al., 2012; Zilberberg et al., 2016; Arantes & Seoane, 2017).

O rio Buranhém, cuja nascente fica no estado de Minas Gerais, cruza as cidades de Eunápolis e Porto Seguro, desaguardo no Oceano Atlântico ao sul da Bahia, fazendo parte da maior bacia hidrográfica da região (2.672 km²). Ao longo dos 148 km do curso do rio, existem fontes difusas de esgoto doméstico, bem como vários pontos de potencial contaminação por pesticidas e resíduos industriais. Essas pressões ambientais estão relacionadas à ocupação urbana não planejada e ao uso da terra na região, que envolve atividades como agricultura, silvicultura de eucalipto, indústria de polpa de celulose e um severo desmatamento da Mata Atlântica (Oberling et al., 2013; Santos 2013; Silva 2016). Estudos de sedimentologia, assembleias de foraminíferos e microbiota associada a corais sugerem a ocorrência de um gradiente de influência antrópica, associada principalmente à pluma do rio Buranhém, entre os bancos de recifes próximos à costa e os do PNMRF (Seoane et al., 2012; Arantes & Seoane, 2017; Leite et al., 2018).

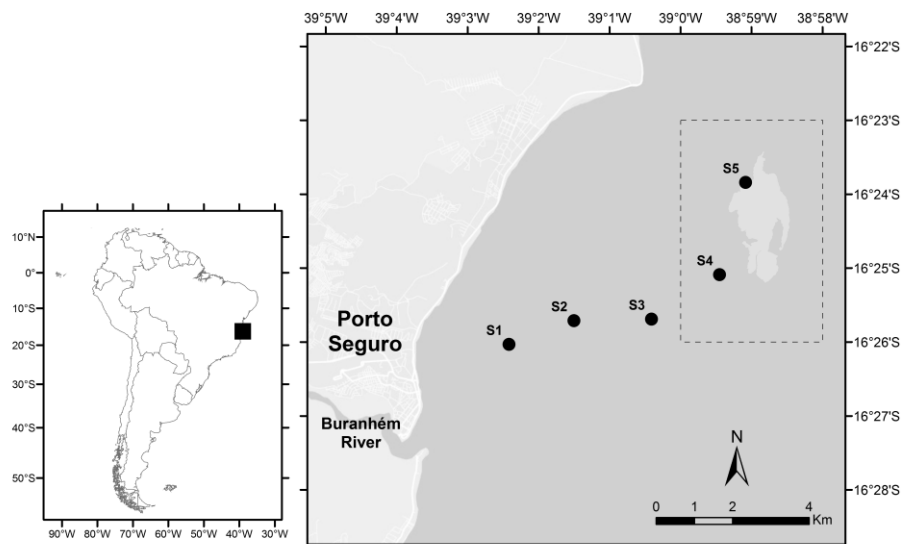


Figura 4- Mapa mostrando as posições dos recifes estudados. O quadrado tracejado representa a área do Parque Natural Municipal do Recife de Fora (PNMRF).

A potencial ocorrência de um gradiente de qualidade ambiental entre os recifes expostos à pluma do rio Buranhém foi avaliada selecionando cinco recifes entre a área da foz do rio e a região do PNMRF (Figura 4). Três sítios de amostragem (S) foram em manchas de recifes fora do PNMRF [S1 (Recife de Itassepocu): $16^{\circ} 26,0349' S - 039^{\circ} 02,4140' W$; S2 (Pedra Carapindauba): $16^{\circ} 25,7138' S - 039^{\circ} 01,4990' W$; e S3 (Baixio Cerca): $16^{\circ} 25,6938' S - 039^{\circ} 00,4080' W$]. Os outros dois sítios foram em recifes localizados dentro da área do parque marinho [S4 (Recife de Fora-SW): $16^{\circ} 25,0910' S - 038^{\circ} 59,4502' W$; e S5 (Recife de Fora-NW): $16^{\circ} 23,8428' S - 038^{\circ} 59,0832' W$].

4.2.2. Coleta de dados

A amostragem foi realizada trimestralmente ao longo de um ano para incorporar a variabilidade temporal (inverno - agosto de 2013; primavera - dezembro de 2013; verão

- fevereiro de 2014; outono - maio de 2014). As coletas foram realizadas com mergulho autônomo em profundidades entre 5 e 8 m. Dados de temperatura e precipitação durante o período de estudo foram adquiridos por uma estação automática localizada em Porto Seguro (código 86745, Instituto Nacional de Meteorologia - INMET).

Amostras de água de fundo (n=3) coletadas em cada sítio e cada tempo amostral foram filtradas, acidificadas (HNO_3 1%) e mantidas protegidas da luz a -20°C até análise. Amostras de sedimento superficial (n=3) foram coletadas em cada sítio e cada tempo amostral e mantidas a -80°C até posterior análise.

Em cada sítio de amostragem, esqueletos de coral foram coletados em cada sítio e cada tempo amostral, e armazenados em sacos plásticos do tipo Ziplock® (6 réplicas por ponto de amostragem) contendo água de cada local. Na base do Projeto Coral Vivo (localizada em Arraial d'Ajuda, Porto Seguro, BA), os fragmentos foram escovados e o sedimento residual da escovação foi distribuído em placas de *Petri* (150 mm) contendo água do local de coleta. Indivíduos de *A. gibbosa* foram identificados, contados e avaliados visualmente quanto ao branqueamento com auxílio de um estereomicroscópio. A frequência de branqueamento na população foi calculada dividindo o número de indivíduos branqueados pelo número total de indivíduos encontrados na amostra.

O material obtido foi transportado com gelo seco ou nitrogênio líquido para o Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Rio Grande (FURG).

4.2.3. Marcadores de qualidade da água

Concentrações de metais podem indicar a presença de algumas atividades humanas. Além disso, eles também são usados para avaliar a saúde ambiental com base em critérios estabelecidos por Diretrizes de Qualidade da Água (CONAMA, 2005; Martins et al., 2012; Prazeres et al., 2012a; Rocha et al., 2017). Os metais cobre (Cu) e zinco (Zn) são essenciais para funções celulares, porém são tóxicos em concentrações altas. Além disso, estão fortemente associados ao esgoto doméstico (Wood et al., 2012). Os metais cádmio (Cd) e chumbo (Pb) são não essenciais e estão mais frequentemente associados a atividades industriais, mas também ao esgoto doméstico (Wood et al., 2011; Tkachenko 2017).

Concentrações dos metais Cu, Zn, Cd e Pb foram determinadas nas amostras de água coletadas neste estudo usando espectrometria de absorção atômica com forno de

grafite acoplado (HR-CS GF AAS, Analytic Jena, Alemanha). O controle de qualidade de laboratório para análise de metais incluiu a análise de material de referência de água do mar para metais residuais NASS-6 (Conselho Nacional de Pesquisa do Canadá NRC - CNRC). Essas análises foram realizadas em laboratórios do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Rio Grande (ICB/FURG).

4.2.4. Marcadores geoquímicos

Considerando a característica integrativa e conservadora da matriz sedimentar ao longo do tempo, parâmetros geoquímicos são amplamente utilizados no diagnóstico de impactos antrópicos. A análise sedimentar de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio tornou-se uma ferramenta eficaz e amplamente utilizada para avaliar fontes de matéria orgânica, gradientes rios-oceano e contaminação por nutrientes (Claudino et al., 2015; Jona-Lasinio et al., 2015).

Além disso, muitos compostos orgânicos, como os esteróides e os hidrocarbonetos alifáticos, também conhecidos como biomarcadores moleculares, têm sido aplicados com sucesso para rastrear fontes de contaminação por matéria orgânica e esgoto (Martins et al., 2014; Derrien et al., 2017; Emrich et al., 2017). Como exemplo, os esteróis coprostanol e epicoprostanol, conhecidos como esteróis fecais, são abundantes nas fezes humanas e são usados como traçadores robustos de esgoto doméstico (Martins et al., 2008; Martins et al. 2012; Abreu-Mota et al., 2014; Carreira et al., 2015a). Sitosterol e estigmasterol são comumente relacionados a plantas terrestres superiores, traçando a influência terrestre na matéria orgânica sedimentar (Volkman 1986; Derrien et al. 2017).

Alíquotas de amostras de sedimento foram secas (60°C), maceradas, pesadas (~0,25 mg) e enviadas ao “Stable Isotope Core Laboratory” (Washington State University) para determinação de isótopos estáveis de carbono e nitrogênio. Para análise de isótopos carbono, alíquotas de amostra receberam tratamento ácido para remoção de carbono inorgânico. Os resultados foram expressos como $\delta^{13}\text{C}$ ou $\delta^{15}\text{N}$ em relação a Viena Pee Dee Belemnite (VPDB) e nitrogênio atmosférico, respectivamente.

A análise de esteróis foi realizada apenas em amostras coletadas no inverno e outono. O inverno mostra os maiores valores de precipitação e temperatura mais baixa, integrando assim as respostas de uma estação chuvosa. Por sua vez, o outono mostra a menor precipitação, integrando assim as respostas de uma estação seca. Além disso, esta

temporada corresponde ao final de um período de intensa atividade turística na região de Porto Seguro.

Outras alíquotas de sedimento foram secas a 45°C, maceradas e pesadas. As amostras de sedimento assim como amostras referência/brancos (1 g) receberam padrões internos específicos e passaram por procedimentos de extração de compostos orgânicos por Soxhlet, seguindo o método USEPA 3540. Os extratos foram concentrados até 1 mL, utilizando evaporação rotativa e sob suave corrente de nitrogênio. O enxofre foi removido com cobre ativado. Procedimentos padronizados de fracionamento e dereivatização foram realizados por métodos adaptados de Niencheski & Fillman (2006).

A determinação de esteróides foi realizada por cromatografia gasosa (GC modelo GC-17A FID, Shimadzu). Os compostos foram identificados com base nos tempos de retenção, e comparados a padrões específicos.

4.2.5. Marcadores ecológicos

Efeitos biológicos de estressores ambientais podem ser avaliados em diversos níveis de organização biológica, utilizando espécies bioindicadoras, como por exemplo os foraminíferos bentônicos (Marques et al., 2016).

A densidade populacional de foraminíferos com endossimbiontes pode ser usada como um indicativo de saúde de ecossistemas recifais (Hallock et al. 2003; Kelmo & Hallock 2013). Hallock e colaboradores (2003) desenvolveram um índice numérico, o FORAM INDEX, que utiliza a proporção de espécies com endossimbiontes e espécies heterotróficas para avaliar a qualidade ambiental de ambientes recifais e determinar se as condições detectadas são favoráveis ou não para o proliferamento de comunidades dominadas por organismos calcificadores e fototróficos. Além de alterações populacionais, organismos com endossimbiontes (e. g. corais zooxantelados e foraminíferos do gênero *Amphistegina*), podem sofrer dano em sua relação simbiótica com consequente branqueamento quando expostos a estressores ambientais (Marangoni et al., 2016).

A análise da concentração corporal de clorofila α (Chl α) tem sido utilizada como um biomarcador de nível suborganismal relacionado diretamente à fotossíntese (Schmidt et al., 2011; Meyer et al. 2015; Stühr et al., 2017). Além disso, alguns autores consideram

o nível de Chl a como uma medida indireta da densidade de simbioses (Schmidt et al., 2014).

A frequência de branqueamento nas populações e a densidade populacional de *A. gibbosa* foram avaliadas seguindo os métodos descritos por Hallock et al. (2003). Resumidamente, o número de indivíduos apresentando branqueamento (principalmente branqueamento parcial, ~ 60% da testa com alteração visual) foi contado e dividido pelo número total de indivíduos analisados. Espécimes mortos foram diferenciados pela detecção de branqueamento completo/ausência de protoplasma e/ou ausência de atividade reticulopodal.

O volume do substrato de onde os organismos foram retirados, neste caso esqueletos de coral, foi estimado por ensaio volumétrico. Sendo assim, a densidade de *A. gibbosa* foi calculada considerando o número total de indivíduos vivos contabilizados para cada 1 cm³ de substrato (Prazeres et al., 2017).

A concentração de Chl a em indivíduos de *A. gibbosa* foi determinada após extração com etanol (95%) e mensuração em leitor de microplacas (ELX-800, BioTek, Winooski, VT, EUA), seguindo método descrito por Schmidt et al. (2011). Para cada uma das réplicas (n = 3), o conteúdo de Chl a foi medido em um *pool* de 2 indivíduos, e foi normalizado pelo peso úmido.

4.2.6. Análises estatísticas

A associação entre parâmetros de qualidade ambiental (ecológicos, geoquímicos e os relacionados à água) e a distância entre o sítio de coleta e a foz do rio Buranhém foram avaliadas por correlações lineares exploratórias (correlação de Pearson) (Borcard et al., 2011). A relação entre os marcadores de qualidade ambiental abióticos e os marcadores ecológicos, bem como a identificação dos potenciais direcionadores dos efeitos biológicos observados, foram analisados por meio de Análise de Redundância (RDA) (Borcard et al. 2011). As análises estatísticas foram realizadas utilizando linguagem de programação R (R Core Team, 2017).

4.3. Síntese material e métodos - Anexo III: **O cobre reduz a tolerância do foraminífero com endossimbionte *Amphistegina gibbosa* às mudanças climáticas**

4.3.1. Coleta e aclimação

Foraminíferos da espécie *A. gibbosa* foram coletados em recifes localizados dentro da área do PNMRF (Fig 4) seguindo métodos descritos na seção 4.1.2. Indivíduos adultos (diâmetro maior que 0.6 mm) e saudáveis (apresentando coloração normal) foram triados para uso no experimento a ser descrito.

Indivíduos de *A. gibbosa* foram mantidos em gaiolas adaptadas a partir de tubos falcon (50 mL), distribuídas ao longo de 24 aquários em um sistema experimental de fluxo aberto e contínuo. As gaiolas foram parcialmente cobertas com malha de plâncton (300 µm) para permitir a troca de água e evitar fuga. As gaiolas foram cobertas por uma camada de tecido escuro (Sombrite®) para reduzir os níveis de irradiância (Schmidt et al., 2014; Marques et al., 2017). Os organismos foram aclimatados ao sistema por 10-15 dias antes do início do experimento.

4.3.2. Abordagem experimental

Usar uma abordagem de mesocosmo permite mais realismo e relevância ambiental do que os experimentos tradicionais de laboratório (Bellworthy & Fine 2018), pois podem ser considerados um elo entre experimentos de campo e laboratório, mimetizando a complexidade e variabilidade do campo (Stewart et al., 2013).

Para este capítulo, foi realizado um experimento no mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo, localizado na praia de Araçaípe em Arraial d'Ajuda, Porto Seguro, BA. O sistema, descrito em detalhe por Duarte et al. (2015), imita as condições do recife de onde a água é captada, seguindo a variabilidade diária natural dos parâmetros ambientais como luz e pluviosidade e de físico-químicos da água como temperatura, salinidade e pH.

Quatro tratamentos foram montados inicialmente: 1 = Ambiente, ou nenhum tratamento; 2 = Acidificação marinha (AM), acidificação em 0,3 unidades de pH; 3 = aquecimento, aumento da temperatura da água do mar em 2°C; 4 = AM + Aquecimento, aumento da temperatura da água do mar (+2°C) e redução do pH (-0,3 unidades de pH),

simultaneamente. Os níveis de aquecimento e acidificação escolhidos foram baseados em cenários previstos pelo IPCC, e com base em resultados obtidos em experimentos anteriores.

A acidificação foi obtida pela injeção de gás carbônico (CO₂) em reservatórios de 5000 L. O aquecimento foi obtido com auxílio de resistências de aço inoxidável. Estes tratamentos de mudanças climáticas foram combinados com tratamentos de contaminação por cobre (dois níveis) em um desenho experimental ortogonal. Soluções estoque de cobre (preparadas a partir de cloreto de cobre, CuCl₂) eram adicionadas diariamente a reservatórios secundários de "tratamento de cobre" com o objetivo de atingir adição de 0 e +5 µg l⁻¹ Cu (concentração nominal) em cada aquário.

Cada um dos oito tratamentos (quatro níveis de “mudanças climáticas” combinados a dois níveis de “contaminação por cobre”) foi replicado em três aquários. Cada um dos 24 aquários tinha um volume de 10 L, com uma taxa de renovação de 3 vezes seu volume de água por hora. Cada aquário continha três gaiolas. Em uma das gaiolas foram inseridos ~15 indivíduos de *A. gibbosa* para análise de biomarcadores bioquímicos. Uma segunda gaiola continha 5 indivíduos para ensaios de respiração. Em uma terceira gaiola foram inseridos 5 indivíduos para análise das taxas de crescimento.

As respostas biológicas foram avaliadas antes e após 25 dias de exposição.

4.3.3. Biomarcadores fisiológicos

Mortalidade e branqueamento

A mortalidade e o branqueamento foram avaliados visualmente com auxílio de um estereomicroscópio (Leica S6D). Os indivíduos mortos foram contados e divididos pelo número total de foraminíferos da gaiola. Ausência de atividade pseudopodial e / ou a presença de um testa completamente branca foram indicativos de morte. Indivíduos branqueados (detalhes descritos na 4.1.5) foram contados e divididos pelo número total de indivíduos vivos na gaiola.

Respiração e crescimento

As taxas de respiração estão relacionadas ao metabolismo energético (Baird et al., 2007; Lukasik & Laskowski, 2007) e são reconhecidas como um parâmetro fisiológico relevante na avaliação da toxicidade (Martins et al., 2007; Oliveira et al., 2018). A

manutenção de taxas normais de crescimento está diretamente relacionada à performance fisiológica “normal” (Baird et al. 2007), e no caso de organismos calcificadores, é também essencial para a manutenção da produção de carbonato de cálcio (Zilberberg et al., 2016).

Um *pool* contendo aproximadamente 5 indivíduos de tamanho similar foi usada para análise de consumo de oxigênio/respiração. As taxas de respiração foram determinadas em uma câmara de incubação (1 ml) medindo as mudanças na concentração de oxigênio durante uma fase escura de 15 minutos em um microrespirômetro (Oxygraph + System, Hansatech Instruments).

Os indivíduos *A. gibbosa* foram fotografados no início e no final do experimento. As fotografias tiradas com câmera (Fujifilm FinePix S2800HD) acoplada ao microscópio foram usadas para medições de área de superfície (mm^2), com o software ImageJ 1.48v. A variação no tamanho foi calculada da seguinte forma: $\Delta\text{Tamanho} = [(\text{área final} - \text{área inicial}) / (\text{área inicial})]$, considerando a média da área de cada gaiola.

4.3.4. Biomarcadores bioquímicos

Enzimas transportadoras de íons estão diretamente envolvidas na homeostase celular por regular a concentração de íons, e consequentemente participam de diversos processos fisiológicos, como por exemplo a calcificação. Particularmente, diversos autores propõem que a Ca^{2+} -ATPase e a H^{+} -ATPase tem papéis na calcificação dos foraminíferos (Nooijer et al., 2014; Toyofuku et al., 2017), corais (Al-Horani et al., 2003; Tresguerres, 2016) e algas calcárias (Borowitzka & Larkum, 1987; McConnaughey & Falk, 2014; Hofmann et al., 2016). Além disso, ATPases são frequentemente utilizadas como biomarcadoras de efeito de metais (Prazeres et al., 2012b; Wood et al., 2012; Marangoni et al., 2017; Marques et al., 2017).

Indivíduos vivos foram congelados em nitrogênio líquido e mantidos a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a realização de análises bioquímicas. A clorofila α foi extraída e determinada de acordo com o método desenvolvido por Schmidt et al. (2011), descrito na seção 4.1.5. As atividades das ATPases foram determinadas pela adaptação dos protocolos existentes (Vajreswari et al., 1983; Ip et al., 2015). Amostras contendo pools de aproximadamente 5 indivíduos cada foram homogeneizadas num tampão (pH ajustado para 7,6) contendo

100 mM de imidazol, 500 mM de sacarose, 5 mM de EDTA, 1 mM de DL-ditiotreitol e 0,1 mM de inibidor de protease. Após sonicação em gelo, as amostras foram centrifugadas a 10 000 g durante 10 minutos a 4 ° C. A concentração total de proteína do sobrenadante foi quantificada utilizando um BioDrop (µLite BioDrop, Cambridge, UK). As amostras foram incubadas por 30 min (30°C) com 100 µl de soluções de trabalho.

Para determinação da atividade de Ca-ATPase, foi utilizada a solução de trabalho 1 (pH ajustado para 7,6) com 20 mM de Tris ácido, 189 mM de NaCl, 2 mM de CaCl₂, 1 mM de ouabaína e 3 mM de ATP. Testes preliminares foram realizados para otimizar a concentração de substrato (CaCl₂) (dados não mostrados). Para determinação da atividade de H⁺-ATPase, os sobrenadantes foram incubados com solução de trabalho 2 (pH ajustado para 7,6) contendo Imidazol 20 mM, NaCl 189 mM, ouabain 1 mM e ATP 3 mM com e sem o inibidor de H⁺-ATPase bafilomicina A1 (1 µM).

As atividades das ATPases foram medidas como a quantidade de fosfato inorgânico (Pi) produzido após o período de incubação. A determinação de Pi foi realizada utilizando um kit comercial (MAK030, Sigma-Aldrich). Os resultados foram normalizados pela concentração de proteína.

4.3.5. Cálculo IBR

Ferramentas integrativas capazes de sintetizar respostas biológicas em um único valor, indicando o nível de saúde do ecossistema, são mais compreensíveis e mais práticas para reguladores/tomadores de decisões ambientais e o público em geral (Hagger et al., 2010; Pérez-Ruzafa et al. 2018). Além disso, o uso desses índices permite uma avaliação mais holística da saúde do organismo e pode destacar tendências que não são claras ao analisar cada parâmetro individualmente. Índices de Resposta Integrada a Biomarcadores (IBR) têm sido utilizados para monitorar e medir os efeitos da poluição (Hagger et al. 2010; Benedetti et al., 2012; Devin et al., 2014; Nardi et al., 2018; Vieira et al., 2019). Recentemente, eles também estão sendo aplicados em um contexto de mudanças climáticas (Madeira et al., 2018; Maulvault et al., 2019).

A fim de integrar respostas de múltiplos biomarcadores, o índice de Resposta Integrada aos Biomarcadores (Integrated Biomarker Response – IBR) (Beliaeff & Burgeout 2002) foi aplicado para cada combinação de tratamento.

O índice foi calculado de acordo com Devin et al. (2014), usando scripts para programação em R fornecidos pelo autor. Mais detalhes sobre fórmulas e interpretações podem ser vistos em Devin et al. (2014), Bertrand et al. (2018), e Silva et al. (2018). Em resumo, o cálculo considera a área de um triângulo definido pelos valores padronizados de dois biomarcadores sucessivos, levando em consideração a variabilidade e o número de biomarcadores. Para obter o valor final do IBR, várias permutações são executadas alterando a ordem dos biomarcadores (Devin et al., 2014).

4.3.6. Análises estatísticas

O efeito combinado do aquecimento, acidificação marinha e exposição ao Cu em cada biomarcador foi avaliado usando modelos lineares generalizados (GLMs; AM, aquecimento e Cu como fatores fixos). As frequências de branqueamento e mortalidade foram avaliadas usando GLMs com família binomial. Todos os outros parâmetros foram avaliados usando GLMs com a família Gamma (log como função de ligação).

No caso do IBR, para comparar todas as médias com o cenário ambiente / sem Cu, foram usados testes-t pareados com p valor corrigido pelo número de comparações.

Padrões gerais das respostas de parâmetros biológicos e do IBR foram avaliados com uma Análise de Componentes Principais (PCA). As variáveis foram centralizadas e normalizadas antes da análise. Para visualizar e explorar as possíveis relações das variáveis, também foram realizadas correlações lineares exploratórias (correlações de Pearson) (Borcard et al. 2011).

4.4. Síntese material e métodos - Anexo IV: **Impacto cumulativo de mudanças climáticas e do herbicida diuron na ecofisiologia da alga calcária *Halimeda opuntia*.**

4.4.1. Coleta e aclimação

Fragmentos da macroalga calcária *Halimeda opuntia* foram coletados no Recife Davies (18° 49,801' S - 147° 39,0971 W), localizado na parte central do Parque Marinho da Grande Barreira de Corais da Austrália. As algas foram distribuídas e aclimatadas em nove tanques do “Simulador Marinho Nacional” - (National Sea Simulator, SeaSim) no Instituto Australiano de Ciências Marinhas (Australian Institute of Marine Science -

AIMS, Townsville). Três tanques simulavam a temperatura da água e as condições de $p\text{CO}_2/\text{pH}$ projetadas para o ano de 2050, outros três simulavam as condições projetadas para 2100 (ambos cenários classificados como RCP 6 dentro do relatório mais recente do IPCC), e os três últimos tanques simulavam condições ambientais “normais”. Esses tanques estavam ligados a um sistema experimental de larga escala e fluxo contínuo, e abrigavam múltiplos organismos (corais, esponjas, equinodermos, ervas marinhas, foraminíferos, peixes e outros táxons) em uma abordagem experimental de mesocosmo.

Nos tanques “ambiente” as temperaturas eram baseadas em médias históricas para o recife Davies (variando de 23,4°C durante o inverno a 28,3°C durante o verão) e a $p\text{CO}_2$ era de ± 410 ppm. Nos tanques “2050”, as temperaturas eram 1°C acima da temperatura ambiente e a $p\text{CO}_2$ era de ± 685 ppm. Nos tanques “2100”, temperaturas 2°C acima da ambiente e $p\text{CO}_2$ de ± 940 ppm.

Após oito meses de aclimação aos três cenários climáticos a partir dos tanques de mesocosmo, talos recém-formados de *H. opuntia* (~ 5 cm cada) foram cortados e realocados em tratamentos experimentais descritos abaixo.

4.4.2. Desenho experimental

As macroalgas foram expostas por 15 dias aos três cenários de mudanças climáticas (ambiente, 2050 e 2100 com alterações de temperatura e pH simultaneamente) combinados a seis concentrações de diuron. As exposições foram feitas em câmaras de acrílico personalizadas (volume de trabalho: 2,5 L; 54 câmaras totais, 3 para cada combinação de tratamento), mantidas em um sistema de fluxo contínuo de água e distribuídas em três “banhos-maria”. Os “banhos -maria” foram usados para manter os tratamentos de temperaturas (semelhantes aos tanques de mesocosmo com médias de 28, 29 e 30°C para condições de verão). O movimento da água, bem como os níveis de $p\text{CO}_2$ previstos para cada cenário climático foram alcançados por borbulhamento suave de uma mistura de ar e CO_2 . Os tratamentos eram controlados digitalmente pelo controlador lógico programável (PLC) do SeaSim.

Seis concentrações de diuron (concentrações nominais: controle com solvente (0); 0,3; 1; 3; 10 e 30 $\mu\text{g l}^{-1}$ de diuron) foram aplicadas. Reservatórios (60 L) foram preenchidos diariamente com água do mar filtrada a 0,5 μm e “contaminados” com solução estoque de diuron em volume apropriado para atingir as concentrações alvo. A

água dos reservatórios era transportada via fluxo contínuo para as câmaras experimentais usando bombas peristálticas (Masterflex L / S e Ismatec IPC 12). A taxa de renovação foi de 1,5 o volume da câmara por dia, e a posição das câmaras foi aleatorizada dentro dos “banhos-maria” para minimizar efeitos de posição e tanque. Os níveis de luz durante a exposição eram de aproximadamente $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (ciclo claro/escuro de 12/12 h).

Este trabalho teve um objetivo adicional, não listado entre os objetivos gerais da tese como um todo, que foi também avaliar se a aclimação a longo prazo às condições de mudanças climáticas leva a diferentes respostas aos múltiplos estressores. Para isso, metade das algas utilizadas no experimento já havia sido aclimatada a cenários de mudanças climáticas (previsões ambientais, 2050 e 2100) por oito meses, e a outra metade foi retirada apenas de tanques de mesocosmo em condição ambiental (ou seja, foram de fato expostas aos cenários de mudanças climáticas apenas pelos 15 dias de duração do experimento de efeitos combinados).

4.4.3. Biomarcadores fisiológicos

Biomarcadores fisiológicos associados a fotossíntese e calcificação:

Rendimento quântico efetivo

Reduções no rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) correspondem a reduções na eficiência da conversão de energia fotoquímica no fotossistema II (Genty et al., 1989). O $\Delta F/F_m'$ é um parâmetro sensível e comumente utilizado em estudos de fotobiologia, que responde de forma consistente a exposição a herbicidas através de inibição (van Dam et al., 2012b; Flores et al. 2013; Wilkinson et al., 2017). A performance fotossintética foi avaliada usando um fluorômetro de pulso de amplitude modulada Imaging-PAM (I-PAM, Walz GmbH, Alemanha), uma técnica não invasiva aplicada para medir a eficiência fotoquímica.

O rendimento quântico efetivo ($\Delta F/F_m'$) foi medido em cada indivíduo usando um fluorômetro Imaging-PAM após adaptação a luz (5 min). O software Data-MAXI (Imaging Win, Walz GmbH, Alemanha) foi usado para selecionar 3-6 áreas de interesse (AOI) e a média de AOIs foi usada como valor final para cada fragmento individualizado de *H. opuntia*.

Quantificação da produção de oxigênio e taxas de calcificação

Incubações foram realizadas em câmaras acrílicas transparentes de 50 mL com agitação contínua, acopladas a placas submersas em banho-maria sob a mesma temperatura das câmaras experimentais. Um fragmento de *Halimeda* proveniente de cada câmara foi incubado durante 1 h na luz ($\sim 150 \text{ pmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e subsequentemente durante 1 h no escuro. Brancos (câmaras contendo apenas água) foram executados em paralelo. O oxigênio dissolvido (OD) foi medido (Hach HQ 30d) antes e após as incubações de luz para determinar as taxas de produção de oxigênio.

Antes e após incubações no claro e no escuro, amostras de água foram coletadas para alcalinidade total (AT) e fixadas com cloreto de mercúrio para determinar as taxas de calcificação pela técnica de Anomalia de Alcalinidade (Chisholm & Gattuso 1991). A AT foi determinada usando um titulador robótico Metrohm 855 (Metrohm, Suíça). Múltiplos padrões internos de água do mar e material de referência certificado foram usados para validar a precisão dos resultados da AT. A produção de oxigênio e as taxas de calcificação no claro e no escuro foram normalizadas pelo peso úmido fresco. A calcificação líquida diária foi calculada por 12 horas de luz e 12 horas de escuro.

4.4.4. Biomarcadores bioquímicos

Parâmetros de estresse oxidativo (e. g. antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos, e dano oxidativo a biomoléculas) são amplamente utilizados para avaliar a o estresse fisiológico e a saúde ambiental (Downs et al. 2005; Lesser 2006; Monserrat et al. 2007; Lushchak 2011).

Muitos transportadores de íons estão supostamente relacionados ao processo de calcificação, incluindo Ca-ATPase (Al-Horani et al. 2003; Marin et al., 2012; Hofmann et al. 2016), e são também biomarcadores de estresse fisiológico (Wood et al. 2012). A anidrase carbônica tem múltiplas funções, incluindo equilíbrio ácido-base celular e aquisição / transporte de carbono inorgânico, estando ligada à fotossíntese e à calcificação (Bertucci et al., 2013; Hofmann et al. 2014). Vários autores têm aplicado a anidrase carbonica como um biomarcador ecologicamente relevante de estresse de mudanças climáticas e contaminação (Siddiqui & Bielmyer-Fraser, 2015; Lionetto et al., 2016; Scherner et al., 2016; Bielmyer-Fraser et al., 2018; Marangoni et al., 2019).

Alíquotas (100-200 mg) de amostras de *H. opuntia* foram maceradas com nitrogênio líquido. O material foi sonificado com tampão de homogenização específico para cada análise e centrifugado (10000 x g, 20 min, 4°C). O teor total de proteína foi determinado em cada alíquota utilizando um kit comercial (BioRad, DC Protein Assay Kit) e curvas padrão.

A capacidade antioxidante total (TAC) foi determinada utilizando um kit comercial (TAC - OxiSelect™, Cell Biolabs Inc., San Diego, CA, EUA). Os níveis de peroxidação lipídica (LPO) foram avaliados seguindo o método descrito por Oakes & Kraak (2003). Este método mede a formação de malondialdeído (MDA), um bioproduto do dano oxidativo lipídico, que produz um cromógeno fluorescente mensurado por fluorometria. A atividade da Ca-ATPase foi determinada seguindo o método descrito na seção 4.2.4. A atividade da Anidrase carbônica foi medida pelo método do decaimento de pH (Henry 1991). Resumidamente, 30 µl da amostra homogeneizada foram adicionados a 2 ml de solução tampão de trabalho (225mM de manitol, 75mM de sacarose, 10mM NaH₂PO₄, 10mM TrisBase, pH ajustado para 8.5). Substrato (1 mL de água desionizada saturada com CO₂) foi adicionado ao meio de reação, e o pH foi medido a cada 5 s durante até 30 s. Medidas em branco foram tomadas usando apenas solução tampão de trabalho.

4.4.5. Análises estatísticas

A inibição de $\Delta F/F_m'$ em relação ao controle (ambiente, zero diuron) foi calculada seguindo as equações descritas por Wilkinson et al. (2017). Dados de inibição foram usados para construir curvas dose-resposta, ajustadas usando curvas logísticas de quatro parâmetros no GraphPad Prism v7. Para cada condição de ‘mudança climática’ foi ajustada uma curva, e concentrações de diuron inibindo a $\Delta F/F_m'$ em 50% (EC₅₀) foram determinadas a partir de cada curva.

Para testar os efeitos das condições de mudanças climáticas e concentrações de diuron em cada resposta biológica, foram utilizados modelos mistos lineares usando o pacote *lme4* do R (Bates et al., 2015). As condições de mudança climática e diuron foram usadas como fatores fixos, enquanto a câmara foi usada como um fator aleatório.

5. Resultados e Discussão

5.1. Síntese Anexo I: **Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral**

Neste capítulo de livro de divulgação científica é demonstrada a importância de avaliar e monitorar a saúde dos ecossistemas recifais a partir das principais ferramentas de detecção e acompanhamento dos efeitos dos impactos antrópicos. De forma geral, os mesmos temas abordados na Introdução Geral da presente tese são revisados, conceituados e discutidos no Anexo I, utilizando-se uma linguagem menos técnico-científica para alcançar um público-alvo com variados graus de embasamento científico.

5.2. Síntese Anexo II: **Qualidade ambiental em recifes de coral do Atlântico Sudoeste: indicadores geoquímicos, de qualidade da água e ecológicos**

Os indicadores geoquímicos e de qualidade da água mostraram que os recifes próximos à descarga fluvial experimentam enriquecimento de nutrientes e contaminação por esgoto doméstico, além de concentrações de metais acima das diretrizes internacionais de qualidade ambiental. Níveis mais altos de contaminação foram fortemente relacionados à maior frequência de branqueamento e menor densidade em populações de *A. gibbosa*.

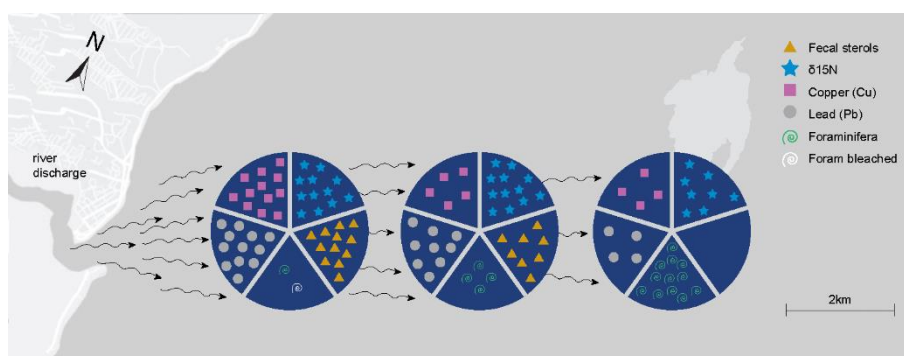


Figura 5 – Resumo gráfico / ilustrativo dos principais resultados encontrados no Anexo I. A influência antrópica (representada pelas setas) diminui conforme a distância da costa aumenta. A diminuição da influência antrópica é relacionada principalmente à decrescente concentração de cobre, chumbo, esteróis fecais e $\delta^{15}\text{N}$, assim como à crescente densidade populacional do foraminífero *A. gibbosa* com endossimbionte, e menor frequência de branqueamento.

A maior concentração de coprostanol observada nos recifes amostrados foi de $0,41 \mu\text{g g}^{-1}$. Essa concentração indica contaminação, porém com menor intensidade do que em muitos estuários (Carreira et al. 2015a; Cabral et al., 2018) e mesmo recifes próximos a centros de alta densidade populacional (Emrich et al. 2017; Castellanos-Iglesias et al., 2018). O nível de coprostanol foi maior nos locais de amostragem próximos à costa e não foi detectado nos locais de amostragem localizados dentro do PNMRF, indicando que não há contaminação fecal detectável dentro da área do parque marinho. A maioria dos estudos que avaliam esteróis fecais no Brasil foi realizada em sistemas estuarinos tropicais e subtropicais (Martins et al. 2014; Carreira et al., 2015b). Nosso estudo é o primeiro a relatar a análise de esteróis em sistemas de recifes de corais do Atlântico Sul.

Neste estudo, as maiores concentrações de metais estão relacionadas com a maior proximidade com a costa. Este é um resultado esperado, considerando que os rios são um dos principais propulsores da contaminação por metais para áreas costeiras (van Dam et al. 2011; Martins et al. 2012; Rocha et al. 2017). Além disso, este resultado corrobora com os de outros estudos sobre gradientes de distância de descarga fluvial (Machado et al. 2016; Lopes-Rocha et al., 2017). Em relação às diretrizes de qualidade da água, as concentrações de Cu e Cd na água do mar coletada no sítio 1 durante o inverno foram superiores aos níveis permitidos pelas atuais diretrizes ambientais brasileiras (CONAMA, 2005) e dos EUA (USEPA). Isso reforça a hipótese de que a influência do rio Buranhém reduz a qualidade da água nos recifes costeiros de Porto Seguro. Concentrações de Pb em todos os locais de amostragem e estações estiveram acima dos critérios atuais de qualidade da água.

O efeito marcante do cobre no branqueamento observado no presente estudo também foi relatado por Prazeres et al. (2012) em foraminíferos de recifes de Fernando

de Noronha (PE, Brasil). Os níveis mais elevados de clorofila α observados nos foraminíferos do sítio 4, que apresentavam a menor frequência de branqueamento, indicaram uma população saudável.

A avaliação integrada de isótopos estáveis, esteróis e metais forneceu um diagnóstico consistente sobre a influência do esgoto nos recifes estudados. Além disso, respostas biológicas evidenciaram efeitos ecológicos relevantes. Em resumo, os recifes localizados dentro da área do PNMRF encontram-se em bom estado de conservação com relação a contaminação ambiental. Os recifes próximos à costa, por sua vez, estão poluídos por esgoto doméstico (evidência de contaminação concomitante com observação de efeito biológico). Os indicadores geoquímicos, de qualidade da água e ecológicos empregados no presente estudo foram eficazes como ferramentas de biomonitoramento a serem aplicadas em recifes em todo o mundo.

5.3. Síntese Anexo III: **O cobre reduz a tolerância do foraminífero com endossimbionte *Amphistegina gibbosa* às mudanças climáticas.**

O cobre foi o principal fator causando os efeitos observados em *A. gibbosa*. O aumento de temperatura também se mostrou um fator importante de estresse fisiológico. De forma geral, a exposição simultânea a aquecimento e acidificação marinha pouco afetou os organismos estudados. As taxas de mortalidade, branqueamento e respiração foram maiores nos foraminíferos expostos aos três estressores combinados (acidificação, aquecimento e contaminação por cobre). As taxas de crescimento foram afetadas pelo aumento da temperatura. As enzimas relacionadas à calcificação foram inibidas principalmente em resposta ao cobre.

Biomarcadores de relevância ecológica responderam a cenários realistas e evidenciaram o estresse geral gerado pela ocorrência de mudanças climáticas combinada com contaminação por cobre. Essas alterações levaram a altos valores para o índice de estresse (IBR) - indicando comprometimento geral da saúde organismal.

Nossos resultados aumentam a compreensão da ecofisiologia dos foraminíferos e fornecem informações para o manejo de recifes de corais, detectando potenciais ferramentas de monitoramento.

Resultados de múltiplos biomarcadores indicaram que a contaminação por cobre reduz a tolerância dos foraminíferos aos estressores das mudanças climáticas (pH e temperatura). Considerando que os biomarcadores analisados possuem alta relevância ecológica, e também que as respostas foram avaliadas em uma espécie bioindicadora clássica de recifes, esses resultados evidenciam o alto risco da combinação de mudanças climáticas e poluição por metais em recifes de coral.

5.4. Síntese Anexo IV: **Impacto cumulativo de mudanças climáticas e do herbicida diuron na ecofisiologia da alga calcária *Halimeda opuntia*.**

A eficiência fotossintética ($\Delta F/F_m'$) foi inibida pelo diuron, exibindo uma típica relação concentração-resposta. O valor médio de EC_{50} para $\Delta F/F_m'$ (concentração que levou a 50% de inibição no parâmetro) em *H. opuntia* mantida em condição ambiente foi de $6.6 \mu\text{g l}^{-1}$ de diuron. O EC_{50} para *H. opuntia* aclimatada ao cenário de 2050 foi de $14,2 \mu\text{g l}^{-1}$, enquanto o EC_{50} para as não aclimatadas/apenas expostas ao cenário por 15 dias foi de $4.3 \mu\text{g l}^{-1}$ de diuron. Considerando o cenário para 2100, o EC_{50} foi de 4,3 para as algas previamente aclimatadas, e $2,45 \mu\text{g l}^{-1}$ de diuron para as expostas ao cenários por 15 dias.

Os valores de EC_{50} encontrados neste estudo sugerem que *H. opuntia* é resiliente ao diuron, em comparação com corais e gramas marinhas. Corais de diversas espécies apresentam 50% de inibição da eficiência fotossintética sob concentrações de diuron de $\pm 4,2 \mu\text{g l}^{-1}$ (van Dam et al., 2015), enquanto que gramas marinhas de diferentes espécies apresentam EC_{50} em $\Delta F/F_m'$ variando de 2,9 a $2,4 \mu\text{g l}^{-1}$ de diuron (Flores et al. 2013; Wilkinson et al. 2017).

Além disso, a exposição ao diuron inibiu a produção de oxigênio (fotossíntese) e reduziu a capacidade antioxidante da alga calcária *H. opuntia*. O cenário climático previsto para o ano de 2100 combinado com a exposição ao diuron levaram às mais fortes reduções nas taxas de calcificação e fotossíntese, a uma indução do sistema antioxidante e à inibição de enzimas relacionadas à calcificação.

A aclimação a longo prazo às condições climáticas reduziu a sensibilidade da fotossíntese ao diuron (maior EC_{50} para $\Delta F/F_m'$ de algas aclimatadas). Algas aclimatadas

também mostraram menor capacidade antioxidante total, maior $\Delta F/F_m'$ e produção de oxigênio do que seus “pares” não aclimatados.

A resiliência de *Halimeda opuntia* ao diuron diminui em condições de mudanças climáticas, destacando a necessidade de diretrizes de qualidade da água ajustadas ao clima.

5.5. Discussão geral

As hipóteses *i* e *ii* desta tese foram corroboradas pelos resultados encontrados no Anexo II. Parâmetros de qualidade ambiental se correlacionam com a distância da costa, evidenciando um gradiente de influência antrópica marcado pela contaminação por esgoto e por metais. Foraminíferos coletados em recifes próximos à foz do rio Buranhém foram expostos a maiores concentrações de metais e esteróis fecais, apresentaram maior frequência de branqueamento, menor teor de clorofila α e menor densidade populacional, evidenciando efeitos biológicos decorrentes do gradiente de influência antrópica.

A avaliação integrada de isótopos estáveis, esteróis fecais, metais e efeitos ecológicos forneceu um diagnóstico consistente indicando influência terrestre e antrópica nos recifes mais próximos da costa. Entretanto, é importante ressaltar que muitos fatores associados à distância do rio (incluindo variáveis não avaliadas no presente trabalho) podem estar envolvidos nas respostas observadas.

No presente estudo, metais, contaminação por esgoto doméstico e efeitos ecológicos prejudiciais foram relacionados à distância da foz do rio. O manejo adequado de bacias hidrográficas e do uso da terra são cruciais para a conservação de recifes de corais (Brodie et al., 2017; Takesue & Storlazzi, 2017), especialmente quando combinados com o monitoramento de recifes de corais.

É importante ressaltar também que os resultados biológicos encontrados nos anexos II e III se referem a respostas de um holobionte, refletindo as alterações induzidas na fisiologia do foraminífero hospedeiro, nas microalgas endossimbiontes, em toda a microbiota associada, e na relação simbiótica como um todo. De forma geral, as diatomáceas endossimbiontes no gênero *Amphistegina* pertencem principalmente à família *Fragilariaceae*, e a nível de espécie e subclados são espécie (hospedeiro)-

específicas e até mesmo variam significativamente entre organismos da mesma espécie coletados em diferentes localidades (Barnes, 2016).

A hipótese *iii* desta tese foi parcialmente refutada pelos resultados encontrados no Anexo III. A maioria dos biomarcadores analisados foram alterados pela contaminação por cobre e alguns pelo aumento de temperatura, mas de forma geral não foram significativamente alterados por cenário realista de mudança climática (cenário com aquecimento + acidificação). A hipótese *iv*, por sua vez, foi corroborada pelos resultados encontrados no Anexo II. Efeitos dos estressores relacionados a mudanças climáticas são agravados quando há co-exposição ao cobre, padrão já identificado em outros trabalhos (Negri & Hoogenboom 2011; Fonseca et al. 2017; Marques et al. 2017; Dornelles Zebral et al., 2019) .

Efeitos da co-exposição a acidificação, aquecimento e cobre em *Amphistegina gibbosa* foram observados em muitos níveis de organização biológica. Além disso, desvios da condição “normal” foram calculados e integrados em um índice de “estado de saúde”, o IBR. Até onde sabemos, este foi o primeiro estudo que avaliou o aumento da temperatura e a acidificação dos oceanos combinada com a exposição a metais em um organismo que vive em recifes. Um dos principais resultados deste estudo foi a tolerância relativa de *A. gibbosa* aos cenários de mudanças climáticas testados. Além disso, o cobre prejudica esta tolerância mesmo em concentrações relativamente baixas, e causa efeitos prejudiciais detectáveis ao longo de múltiplos níveis de organização biológica. A atividade da H^+ -ATPase foi medida diretamente pela primeira vez em um foraminífero e é sugerida como um biomarcador bioquímico de efeito do cobre. A aplicação do IBR forneceu *insights* sobre o "nível geral de estresse do organismo" e resumiu as respostas de vários biomarcadores de maneira consistente.

O cobre foi o principal direcionador das respostas biológicas encontradas nos trabalhos associados a essa tese (anexos II e III), e considerando que os níveis de cobre encontrados em recifes costeiros investigados no Anexo II chegam a ser quatro vezes maiores que os níveis utilizados neste experimento, espera-se que o efeito cumulativo de mudanças climáticas e contaminação por metal no ambiente seja ainda mais preocupante.

As hipóteses v e vi desta tese foram corroboradas pelos resultados encontrados no Anexo IV. Cenários de mudanças climáticas previstos para 2050 e 2100 afetaram a fotossíntese e calcificação em *H. opuntia*. O diuron alterou tanto biomarcadores fisiológicos quanto bioquímicos. De forma geral, a co-exposição ao diuron intensificou os efeitos das mudanças climáticas, o que também tem sido observado em estudos com corais, foraminíferos e gramas marinhas (Negri et al., 2011; van Dam et al. 2012a; Wilkinson et al. 2017).

O uso de aclimação de longa data às mudanças climáticas (aquecimento e acidificação combinados) foi uma característica inovadora deste experimento. Os resultados mostram que o desempenho fisiológico foi semelhante entre algas aclimatadas e não aclimatadas para a maioria dos parâmetros biológicos avaliados. No entanto, parâmetros da fotossíntese (eficiência fotossintética e produção de oxigênio) eram maiores, enquanto a capacidade antioxidante era, de forma geral, maior em *H. opuntia* aclimatadas, em comparação com as não-aclimatadas para o mesmo cenário.

Pouco se sabe sobre o potencial das algas calcárias para se aclimatarem ou se adaptarem às mudanças climáticas (Clark et al., 2013; Zou & Gao, 2013). Vogel e colaboradores (2015a) encontraram evidências de que várias espécies de *Halimeda* podem se aclimatar a condições de acidificação. Em nosso estudo, algas expostas a cenários futuros de mudança climática por 15 dias tiveram desempenho fisiológico/bioquímico semelhante ao de algas mantidas nessas condições por 8 meses. Será que 8 meses de exposição anterior a cenários CC seriam suficientes para aclimação? Os níveis de calcificação e fotossíntese seriam semelhantes aos da condição ambiente se o tempo de pré-exposição fosse maior? Estas questões não puderam ser abordadas neste trabalho, e a adaptação da *Halimeda opuntia* aos cenários de alterações climáticas ainda precisa de mais investigação.

Este estudo preencheu algumas lacunas na pesquisa sobre os efeitos da qualidade da água e de mudanças climáticas em espécies recifais. Valores EC₅₀ foram derivados para *Halimeda* spp. pela primeira vez. Esse tipo de informação será útil para as diretrizes de qualidade da água e para o desenvolvimento de SSDs (curvas de distribuição de sensibilidade de espécies, *species sensitivity distributions*) e destaca a necessidade urgente de desenvolvimento de limites de contaminantes ajustados ao clima. Mudanças

climáticas provavelmente reduzirão a tolerância de *H. opuntia* à contaminação por herbicidas.

Na Grande Barreira de Corais da Australia, um ecossistema relativamente bem monitorado e preservado, o diuron é um dos herbicidas mais frequentemente detectado (em concentrações tóxicas) (Lewis et al. 2009, 2012). O Brasil carece de informações quanto a presença e níveis ambientais de vários contaminantes, incluindo herbicidas. Considerando a extensa literatura acerca dos efeitos danosos de herbicidas em espécies-chave de recifes de coral (van Dam et al. 2012b; Flores et al. 2013; van Dam et al., 2015; Negri et al. 2015; Mercurio et al. 2018), e o efeito combinado do diuron e mudanças climáticas relatados nesta tese, é de extrema importância conhecer e monitorar concentrações de herbicidas nos recifes brasileiros.

Com relação ao **objetivo específico viii**, “Sugerir biomarcadores com potencial para serem utilizados como ferramentas alternativas e complementares ao monitoramento dos efeitos biológicos da contaminação ambiental e das mudanças climáticas em recifes de coral”, a avaliação do branqueamento se constitui como uma ferramenta de baixo custo responsiva à exposição de foraminíferos a metais e mesmo esgoto doméstico. Entre os biomarcadores bioquímicos, ferramentas que supostamente respondem a impactos antes da letalidade e da ocorrência de alterações visuais (como o próprio branqueamento), a atividade da enzima H^+ -ATPase, além de estar associada a processos fisiológicos importantes, responde ao Cu de maneira consistente. A capacidade antioxidante total (TAC) por sua vez, respondeu de forma consistente e com uma marcada relação dose-resposta ao herbicida diuron, sendo então apontada como um biomarcador bioquímico de efeito de herbicidas. Em resposta às mudanças climáticas, parâmetros biológicos relacionados a fotossíntese e enzimas relacionadas a calcificação são indicadas como biomarcadores, tanto em foraminíferos como em algas calcárias.

6. Conclusões

Os resultados relatados nesta tese indicam que os recifes costeiros brasileiros estão sujeitos a múltiplos estressores antrópicos. Recifes de coral localizados próximo à foz do

rio Buranhém, na costa de Porto Seguro (BA, Brasil), apresentaram reduzida qualidade ambiental decorrente de contaminação por esgoto doméstico e metais.

Os recifes localizados dentro da área do PNMRF podem ser considerados como bem preservados/conservados, de acordo com os dados de qualidade da água (baixas concentrações de metais) e respostas dos indicadores geoquímicos. As populações de *Amphistegina gibbosa* nesta área eram mais saudáveis (menor frequência de branqueamento, maior densidade populacional e maiores níveis de clorofila α) do que as coletadas nos outros recifes.

O foraminífero com endossimbionte *A. gibbosa* é relativamente resiliente a cenários de mudanças climáticas. No entanto, a contaminação por cobre (mesmo em baixa concentração) reduz a tolerância dos foraminíferos à mudança climática.

Respostas fisiológicas e bioquímicas mostraram que a fotossíntese e que o sistema de defesa antioxidante da alga calcificadora *H. opuntia* foram afetadas pelo diuron seguindo um padrão dose-resposta, e que os futuros cenários de mudança climática aumentaram os efeitos tóxicos do diuron. Mudanças climáticas provavelmente reduzirão a tolerância de *Halimeda opuntia* à contaminação por herbicidas.

A avaliação do branqueamento, de enzimas envolvidas na calcificação e a capacidade antioxidante total se mostraram bons marcadores de estresse ambiental. O índice IBR se mostrou uma eficiente forma de integrar a resposta de diversos biomarcadores e avaliar o grau de estresse de forma mais direta.

A co-ocorrência de estressores globais (aquecimento e acidificação dos oceanos) e locais (contaminação por metais e herbicidas) afeta a ecofisiologia de espécies fototróficas calcificadoras, e representa um risco para a qualidade ambiental de recifes de coral.

7. Referências bibliográficas

Abreu-Mota M, Barboza CA de M, Bícigo MC & Martins CC (2014) Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. *Chemosphere* 103:156–163.

- Al-Horani FA, Al-Moghrabi SM & de Beer D (2003) The mechanism of calcification and its relation to photosynthesis and respiration in the scleractinian coral *Galaxea fascicularis*. *Mar Biol* 142:419–426.
- Andersson AJ & Gledhill D (2013) Ocean acidification and coral reefs: Effects on breakdown, dissolution, and net ecosystem calcification. *Ann Rev Mar Sci* 5:321–348.
- Arantes RCM & Seoane JCS (2017) GIS database applied to environmental modeling in coral reef: Recife de Fora, Porto Seguro, Bahia, Brasil. *Rev Bras Cartogr* 69:1913–1938.
- Baird DJ, Brown SS, Lagadic L, Liess M, Maltby L, Moreira-Santos M, Schulz R & Scott GI (2007) In situ-based effects measures: Determining the ecological relevance of measured responses. *Integr Environ Assess Manag* 3:259–267.
- Ban SS, Graham N a J & Connolly SR (2014) Evidence for multiple stressor interactions and effects on coral reefs. *Glob Chang Biol* 20:681–97.
- Barnes KW (2016) Diversity and distribution of diatom endosymbionts in *Amphistegina* spp. (Foraminifera) based on molecular and morphological techniques. PhD Thesis. University of South Florida. 177 p.
- Bates D, Mächler M, Bolker BM & Walker SC (2015) Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J Stat Softw* 67.
- Beliaeff B & Burgeout T (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environ Toxicol Chem* 21:1316–1322.
- Bellworthy J & Fine M (2018) The Red Sea Simulator: A high-precision climate change mesocosm with automated monitoring for the long-term study of coral reef organisms. *Limnol Oceanogr Methods* 16:367–375.
- Benedetti M, Ciaprinì F, Piva F, Onorati F, Fattorini D, Notti A, Ausili A & Regoli F (2012) A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environ Int* 38:17–28.
- Bergstrom E, Silva J, Martins C & Horta P (2019) Seagrass can mitigate negative ocean acidification effects on calcifying algae. *Sci Rep* 9.
- Bertrand L, Monferrán MV, Mouneyrac C & Amé MV (2018) Native crustacean species as a bioindicator of freshwater ecosystem pollution: A multivariate and

- integrative study of multi-biomarkers response in active river monitoring. *Chemosphere* 206:265–277.
- Bertucci A, Moya A, Tambutté S, Allemand D, Supuran CT & Zoccola D (2013) Carbonic anhydrases in anthozoan corals — A review. *Bioorg Med Chem* 21:1437–1450.
- Bielmyer-Fraser GK, Patel P, Capo T & Grosell M (2018) Physiological responses of corals to ocean acidification and copper exposure. *Mar Pollut Bull* 133:781–790.
- Bôas ABV, Figueiredo MA de & Villaça RC (2005) Colonization and growth of crustose coralline algae. *Brazilian J Oceanogr* 53:147–156.
- Borcard D, Gillet F & Legendre P (2011) *Numerical Ecology with R*. Baltimore.
- Borowitzka MA & Larkum AWD (1987) Calcification in algae: Mechanisms and the role of metabolism. *CRC Crit Rev Plant Sci* 6:1–45.
- Boyd PW, Collins S, Dupont S, Fabricius K, Gattuso J-P, Havenhand J, Hutchins DA, Riebesell U, Rintoul MS, Vichi M, Biswas H, Ciotti A, Gao K, Gehlen M, Hurd CL, Kurihara H, McGraw CM, Navarro JM, Nilsson GE, Passow U & Pörtner HO (2018) Experimental strategies to assess the biological ramifications of multiple drivers of global ocean change — A review. *Glob Chang Biol* 24:2239–2261.
- Brodie JE, Lewis SE, Collier CJ, Wooldridge S, Bainbridge ZT, Waterhouse J, Rasheed MA, Honchin C, Holmes G & Fabricius K (2017) Setting ecologically relevant targets for river pollutant loads to meet marine water quality requirements for the Great Barrier Reef, Australia: A preliminary methodology and analysis. *Ocean Coast Manag* 143:136–147.
- Brown CJ, Saunders MI, Possingham HP & Richardson AJ (2013) Managing for Interactions between Local and Global Stressors of Ecosystems. *PLoS One* 8.
- Cabral AC, Stark JS, Kolm HE & Martins CC (2018) An integrated evaluation of some faecal indicator bacteria (FIB) and chemical markers as potential tools for monitoring sewage contamination in subtropical estuaries. *Environ Pollut* 235:739–749.
- Campbell JE, Fisch J, Langdon C & Paul VJ (2016) Increased temperature mitigates the effects of ocean acidification in calcified green algae (*Halimeda* spp.). *Coral Reefs* 35:357–368.
- Carreira RS, Albergaria-Barbosa ACR, Arguelho MLPM & Garcia CAB (2015a)

- Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. *Mar Pollut Bull* 90:312–316.
- Carreira RS, Cordeiro LGMS, Oliveira DRP, Baêta A & Wagener ALR (2015b) Source and distribution of organic matter in sediments in the SE Brazilian continental shelf influenced by river discharges: An approach using stable isotopes and molecular markers. *J Mar Syst* 141:80–89.
- Castellanos-Iglesias S, Cabral AC, Martins CC, Di Domenico M, Rocha RM & Haddad MA (2018) Organic contamination as a driver of structural changes of hydroid 's assemblages of the coral reefs near to Havana Harbour, Cuba. *Mar Pollut Bull* 133:568–577.
- Castro CB & Pires DO (2001) Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. 69:357–371.
- Chisholm J & Gattuso J (1991) Validation of the alkalinity anomaly technique for investigating calcification and photosynthesis in coral reef communities. *Limnol Oceanogr*:1232–1239.
- Claar DC, Szostek L, Mcdevitt-Irwin JM, Schanze JJ & Baum JK (2018) Global patterns and impacts of El Niño events on coral reefs: A meta-analysis. *PLoS One* 13.
- Clark JS, Poore AGB, Ralph PJ & Doblin MA (2013) Potential for adaptation in response to thermal stress in an intertidal macroalga. *J Phycol* 49:630–639.
- Claudino MC, Pessanha ALM, Araújo FG & Garcia AM (2015) Trophic connectivity and basal food sources sustaining tropical aquatic consumers along a mangrove to ocean gradient. *Estuar Coast Shelf Sci* 167:45–55.
- CONAMA (2005) Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Brasília, Brasil.
- Cooper TF, Gilmour JP & Fabricius KE (2009) Bioindicators of changes in water quality on coral reefs: review and recommendations for monitoring programmes. *Coral Reefs* 28:589–606.
- Costanza R, D'Arge R, de Groot R, Farber S, Grasso M, Hannon B, Limburg K, Naeem S, O'Neill R V., Paruelo J, Raskin RG, Sutton P & van den Belt M (1997) The value of the world's ecosystem services and natural capital. *Nature* 387:253–260.
- Crain CM, Kroeker K & Halpern BS (2008) Interactive and cumulative effects of

- multiple human stressors in marine systems. *Ecol Lett* 11:1304–1315.
- Depledge MH, Aagaard A & Gyorkost P (1995) Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers. *Mar Pollut Bull* 31:19–27.
- Derrien M, Yang L & Hur J (2017) Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: A review. *Water Res* 112:58–71.
- Devin S, Burgeout T, Minguez L & Pain-Devin S (2014) The integrated biomarker response revisited: Optimization to avoid misuse. *Environ Sci Pollut Res* 21:2448–2454.
- Dornelles Zebral Y, Roza M, Fonseca J da S, Gomes Costa P, de Oliveira CS, Gubert Zocke T, Lemos Dal Pizzol J, Robaldo RB & Bianchini A (2019) Waterborne copper is more toxic to the killifish *Poecilia vivipara* in elevated temperatures: linking oxidative stress in the liver with reduced organismal thermal performance. *Aquat Toxicol* 209:142–149.
- Downs C a, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J & Woodley CM (2002) Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic Biol Med* 33:533–43.
- Downs CA, Fauth JE, Robinson CE, Curry R, Lanzendorf B, Halas JC, Halas J & Woodley CM (2005) Cellular diagnostics and coral health: declining coral health in the Florida Keys. *Mar Pollut Bull* 51:558–69.
- Downs CA, Mueller E, Phillips S, Fauth JE & Woodley CM (2000) A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastraea faveolata*) during heat stress. *Mar Biotechnol* 2:533–544.
- Duarte G, Calderon EN, Pereira CM, Marangoni LFB, Santos HF, Peixoto RS, Bianchini A & Castro CB (2015) A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecol Evol* 5:4555–4566.
- Elliff CI & Kikuchi RKP (2017) Ecosystem services provided by coral reefs in a Southwestern Atlantic Archipelago. *Ocean Coast Manag* 136:49–55.
- Emrich K, Martinez-Colon M & Alegria H (2017) Is untreated sewage impacting coral reefs of Caye Caulker, Belize? *J Foraminifer Res* 47:20–33.
- Fabrizius KE (2005) Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Mar Pollut Bull* 50:125–46.

- Fabricius KE, De'ath G, Humphrey C, Zagorskis I & Schaffelke B (2013) Intra-annual variation in turbidity in response to terrestrial runoff on near-shore coral reefs of the Great Barrier Reef. *Estuar Coast Shelf Sci* 116:57–65.
- Fabricius KE, Logan M, Weeks S & Brodie J (2014) The effects of river run-off on water clarity across the central Great Barrier Reef. *Mar Pollut Bull* 84:191–200.
- Figueiredo MAO (2000) Recifes de corais ou recifes de algas? *Ciência Hoje* 166: 74-75.
- Fitt WK, Brown BE, Warner ME & Dunne RP (2001) Coral bleaching: interpretation of thermal tolerance limits and thermal thresholds in tropical corals. *Coral Reefs* 20:51–65.
- Flores F, Collier CJ, Mercurio P & Negri AP (2013) Phytotoxicity of Four Photosystem II Herbicides to Tropical Seagrasses. *PLoS One* 8:1–12.
- Fonseca J da S, Marangoni LF de B, Marques JA & Bianchini A (2017) Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquat Toxicol* 190:121–132.
- Fragoso dos Santos H, Duarte GAS, Rachid CT da C, Chaloub RM, Calderon EN, Marangoni LF de B, Bianchini A, Nudi AH, do Carmo FL, van Elsas JD, Rosado AS, Castro CBE & Peixoto RS (2015) Impact of oil spills on coral reefs can be reduced by bioremediation using probiotic microbiota. *Sci Rep* 5:18268.
- Furness RW & Rainbow PS (1990) Heavy metals in the marine environment. CRC Press.
- Genty B, Briantais JM & Baker NR (1989) The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron transport and quenching of chlorophyll fluorescence. *Biochim Biophys Acta - Gen Subj* 990:87–92.
- Hagger JA, Galloway TS, Langston WJ & Jones MB (2010) Application of biomarkers to assess the condition of European Marine Sites. *Environ Pollut* 157:2003–2010.
- Hallock P, Lidz BH, Cockey-Burkhard EM & Donnelly KB (2003) Foraminifera as bioindicators in coral reef assessment and monitoring: the FORAM Index. *Environ Monit Assess* 81:221–238.
- Hallock P, Williams DE & Toler SK (2006) Bleaching in foraminifera with algal symbionts: Implications for reef monitoring and risk assessment. In: *Anuário do Instituto de Geociências*. pp. 108–128.

- Halpern BS, Frazier M, Potapenko J, Casey KS, Koenig K, Longo C, Lowndes JS, Rockwood RC, Selig ER, Selkoe KA & Walbridge S (2015) Spatial and temporal changes in cumulative human impacts on the world's ocean. *Nat Commun* 6:1–7.
- Henry RP (1991) Techniques for Measuring Carbonic Anhydrase Activity in Vitro. In: *The Carbonic Anhydrases: Cellular Physiology and Molecular Genetics*. S.J. Dodgson, R.E. Tashian, G. Gros & N.D. Carter (eds). Springer Science+Business Media: New York. pp. 119–125.
- Hillis-Colinvaux L (1980) Ecology and taxonomy of *Halimeda*: primary producer of coral reefs. *Adv Mar Biol* 17:1–327.
- Hoegh-Guldberg O, Mumby PJ, Hooten AJ, Steneck RS, Greenfield P, Gomez E, Harvell CD, Sale PF, Edwards AJ, Caldeira K, Knowlton N, Eakin CM, Iglesias-Prieto R, Muthiga N, Bradbury RH, Dubi A & Hatziolos ME (2007) Coral reefs under rapid climate change and ocean acidification. *Science* (80-) 318:1737–1743.
- Hofmann LC, Heiden JP, Bischof K & Teichberg M (2014) Nutrient availability affects the response of the calcifying chlorophyte *Halimeda opuntia* (L.) J. V. Lamouroux to low pH. *Planta* 239:231–252.
- Hofmann LC, Koch M & Beer D De (2016) Biotic control of surface pH and evidence of light-induced H⁺-pumping and Ca²⁺ - H⁺ exchange in a tropical crustose coralline alga. *PLoS One* 11:1–24.
- Horta PA, Sissini MN, Bergstrom E, Freire V, Bastoa E, Martins G, Lucena LA, Martins C, Barufi JB, Rorig L, Riul R, Gurgel CF (2016) Papel das algas nos recifes e interferências antrópicas. In: Zilberberg et al (Eds). *Conhecendo os recifes brasileiros: Rede de pesquisas Coral Vivo*. Serie Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- IPCC (2014) The Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC). Cambridge University Press, Cambridge, UK.
- Jona-Lasinio G, Costantini ML, Calizza E, Pollice A, Bentivoglio F, Orlandi L, Careddu G & Rossi L (2015) Stable isotope-based statistical tools as ecological indicator of pollution sources in Mediterranean transitional water ecosystems. *Ecol Indic* 55:23–31.
- Jones R (2010) Environmental contamination associated with a marine landfill ('seafill') beside a coral reef. *Mar Pollut Bull* 60:1993–2006.

- Kelmo F & Hallock P (2013) Responses of foraminiferal assemblages to ENSO climate patterns on bank reefs of northern Bahia, Brazil: A 17-year record. *Ecol Indic* 30:148–157.
- Langer MR (2008) Assessing the contribution of foraminiferan protists to global ocean carbonate production. *J Eukaryot Microbiol* 55:163–169.
- Leite DCA, Salles JF, Calderon EN, Castro CB, Bianchini A, Marques JA, van Elsas JD & Peixoto RS (2018) Coral bacterial-core abundance and network complexity as proxies for anthropogenic pollution. *Front Microbiol* 9:1–11.
- Lesser MP (2006) Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and physiological ecology. *Annu Rev Physiol* 68:253–278.
- Lewis SE, Brodie JE, Bainbridge ZT, Rohde KW, Davis AM, Masters BL, Maughan M, Devlin MJ, Mueller JF & Schaffelke B (2009) Herbicides: A new threat to the Great Barrier Reef. *Environ Pollut* 157:2470–2484.
- Lewis SE, Schaffelke B, Shaw M, Bainbridge ZT, Rohde KW, Kennedy K, Davis AM, Masters BL, Devlin MJ, Mueller JF & Brodie JE (2012) Assessing the additive risks of PSII herbicide exposure to the Great Barrier Reef. *Mar Pollut Bull* 65:280–291.
- Lionetto MG, Caricato R, Giordano ME & Schettino T (2016) The complex relationship between metals and carbonic anhydrase: New insights and perspectives. *Int J Mol Sci* 17.
- Lopes-Rocha M, Langone L, Miserocchi S, Giordano P & Guerra R (2017) Spatial patterns and temporal trends of trace metal mass budgets in the western Adriatic sediments (Mediterranean Sea). *Sci Total Environ* 599–600.
- Lough JM, Anderson KD & Hughes TP (2018) Increasing thermal stress for tropical coral reefs: 1871–2017. *Sci Rep* 8.
- Lukasik P & Laskowski R (2007) Increased respiration rate as a result of adaptation to copper in confused Flour Beetle, *Tribolium confusum* Jacquelin du Val. *Bull Environ Contam Toxicol* 79:311–314.
- Lushchak VI (2011) Environmentally induced oxidative stress in aquatic animals. *Aquat Toxicol* 101:13–30.
- Machado AA de S, Spencer K, Kloas W, Toffolon M & Zarfl C (2016) Metal fate and effects in estuaries: A review and conceptual model for better understanding of

- toxicity. *Sci Total Environ* 541:268–281.
- Madeira C, Mendonça V, Leal MC, Flores AA V, Cabral HN, Diniz MS & Vinagre C (2018) Environmental health assessment of warming coastal ecosystems in the tropics – Application of integrative physiological indices. *Sci Total Environ* 643:28–39.
- Magris RA, Grech A & Pressey RL (2018) Cumulative human impacts on coral ceefs: Assessing risk and management implications for Brazilian coral reefs. *Diversity* 10.
- Marangoni LFB, Marques JA, Bianchini A (2016) Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. In: Zilberberg et al (Eds). *Conhecendo os recifes brasileiros: Rede de pesquisas Coral Vivo*. Serie Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Marangoni LF de B, Marques JA, Duarte GAS, Pereira CM, Calderon EN, Castro CB & Bianchini A (2017) Copper effects on biomarkers associated with photosynthesis, oxidative status and calcification in the Brazilian coral *Mussismilia harttoo* (Scleractinia, Mussidae). *Mar Environ Res* 130:248–257.
- Marangoni LFB, Novazzi MMA, Marques JA & Bianchini A (2019) Copper exposure and seawater acidification interaction: Antagonistic effects on biomarkers in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquat Toxicol* 206:123–133.
- Marin F, Roy N Le & Marie B (2012) The formation and mineralization of mollusk shell. *Front Biosci* 4:1099–1125.
- Marques JA, Marangoni LFB, Bianchini A (2016) Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral. In: Zilberberg et al (Eds). *Conhecendo os recifes brasileiros: Rede de pesquisas Coral Vivo*. Serie Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro.
- Marques J, Marangoni LF de B & Bianchini A (2017) Combined effects of sea water acidification and copper exposure on the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina gibbosa*. *Coral Reefs* 36:489–501.
- Martins CC, Bícago MC, Figueira RCL, Lourenço J, Angelli F, Combi T, Gallice WC, Mansur A V, Nardes E, Rocha ML, Wisnieski E, Ceschim LMM & Ribeiro AP (2012) Multi-molecular markers and metals as tracers of organic matter inputs and contamination status from an Environmental Protection Area in the SW Atlantic

- (Laranjeiras Bay, Brazil). *Sci Total Environ* 417–418:158–168.
- Martins CC, Cabral AC, Barbosa-Cintra SCT, Dauner ALL & Souza FM (2014) An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environ Pollut* 188:71–80.
- Martins CDC, Boechat F, Gomes A, Aureliano J & Montone RC (2008) Marcadores orgânicos de contaminação por esgotos sanitários em sedimentos superficiais da Baía de Santos, São Paulo. *Quim Nova* 31:1008–1014.
- Martins JC, Saker ML, Teles LFO & Vasconcelos VM (2007) Oxygen consumption by *Daphnia magna* as a marker of chemical stress in the aquatic environment. *Environ Tox* 26:1987–1991.
- Maulvault AL, Camacho C, Barbosa V, Alves R, Anacleto P, Pousao-Ferreira P, Rosa R, Marques A & Diniz M (2019) Living in a multi-stressors environment: an integrated biomarker approach to assess the ecotoxicological response of meagre (*Argyrosomus regius*) to venlafaxine, warming and acidification. *Environ Res* 169:7–25.
- McConnaughey TA & Falk RH (2014) Calcium-proton exchange during algal calcification. *Biol Bull* 180:185–195.
- Mercurio P, Eaglesham G, Parks S, Kenway M, Beltran V, Flores F, Mueller JF & Negri AP (2018) Contribution of transformation products towards the total herbicide toxicity to tropical marine organisms. *Sci Rep* 8:4808.
- Meyer FW, Vogel N, Teichberg M, Uthicke S & Wild C (2015) The Physiological Response of Two Green Calcifying Algae from the Great Barrier Reef towards High Dissolved Inorganic and Organic Carbon (DIC and DOC) Availability. *PLoS One* 10:1–23.
- Moberg F & Folke C (1999) Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol Econ* 29:215–233.
- Monserrat JM, Martínez PE, Geracitano LA, Lund L, Martinez C, Pinho GLL, Soares I, Ferreira-cravo M, Ventura-lima J & Bianchini A (2007) Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 146:221–234.
- Moore MN, Depledge MH, Readman JW & Paul Leonard DR (2004) An integrated

- biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res - Fundam Mol Mech Mutagen* 552:247–268.
- Nardi A, Benedetti M, Fattorini D & Regoli F (2018) Oxidative and interactive challenge of cadmium and ocean acidification on the smooth scallop *Flexopecten glaber*. *Aquat Toxicol* 196:53–60.
- Negri AP, Flores F, Mercurio P, Mueller JF & Collier CJ (2015) Lethal and sub-lethal chronic effects of the herbicide diuron on seagrass. *Aquat Toxicol* 165:73–83.
- Negri AP, Flores F, Ro T & Uthicke S (2011) Herbicides increase the vulnerability of corals to rising sea surface temperature. *Limnol Oceanogr* 56:471–485.
- Negri AP & Hoogenboom MO (2011) Water contamination reduces the tolerance of coral larvae to thermal stress. *PLoS One* 6.
- Niencheski LF & Fillmann G (2006) Contaminantes: Metais, Hidrocarbonetos e Organoclorados. In: P.C. Lana, A. Bianchini, C.A.O. Ribeiro, L.F.H. Niencheski, G. Fillmann, and C.S.G. Santos (eds.), *Avaliação Ambiental de Estuários Brasileiros: Diretrizes Metodológicas*. Museu Nacional, Rio de Janeiro, RJ. pp. 63-118.
- Nooijer LJ De, Spero HJ, Erez J, Bijma J & Reichart GJ (2014) Biomineralization in perforate Foraminifera. *Earth Sci Rev.*
- Noyes PD, McElwee MK, Miller H, Clark BW, D.Van Tiem LA, Walcott KC, Erwin KN & Levin ED (2009) The toxicology of climate change: Environmental contaminants in a warming world. *Environ Int* 35:971–986.
- Oberling DF, La Rovere EL & Oliveira Silva HV de (2013) SEA making inroads in land-use planning in Brazil: The case of the Extreme South of Bahia with forestry and biofuels. *Land use policy* 35:341–358.
- Oliveira P, Lírío AV, Canhoto C & Guilhermino L (2018) Toxicity of mercury and post-exposure recovery in *Corbicula fluminea*: Neurotoxicity, oxidative stress and oxygen consumption. *Ecol Indic* 91:503–510.
- Pereira-Filho GH, Shintate GSI, Kitahara M V, Moura RL, Amado-Filho GM, Bahia RG, Moraes FC, Mitrano Neves L, Francini CLB, Gibran FZ & Motta FS (2019) The southernmost Atlantic coral reef is off the subtropical island of Queimada Grande (24°S), Brazil. *Bull Mar Sci* 95.
- Pérez-Ruzafa A, Pérez-Marcos M & Marcos C (2018) From fish physiology to

- ecosystems management: Keys for moving through biological levels of organization in detecting environmental changes and anticipate their consequences. *Ecol Indic* 90:334–345.
- Pörtner HO, Langenbuch M & Reipschläger A (2004) Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: Lessons from animal physiology and Earth History. *J Oceanogr* 60:705–718.
- Prazeres M, Roberts TE & Pandolfi JM (2017) Shifts in species abundance of large benthic foraminifera *Amphistegina*: the possible effects of Tropical Cyclone Ita. *Coral Reefs* 36:305–309.
- Prazeres MDF, Martins SE & Bianchini A (2012a) Assessment of water quality in coastal waters of Fernando de Noronha, Brazil: biomarker analyses in *Amphistegina lessonii*. *J Foraminifer Res* 42:56–65.
- Prazeres MDF, Martins SE & Bianchini A (2012b) Impact of metal exposure in the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina lessonii*. In: *12th International Coral Reef Symposium*. pp. 13–16.
- Rees SA, Opdyke BN, Wilson PA & Henstock TJ (2007) Significance of *Halimeda* bioherms to the global carbonate budget based on a geological sediment budget for the Northern Great Barrier Reef, Australia. *Coral Reefs* 26:177–188.
- Roberts DA, Birchenough SNR, Lewis C, Sanders MB, Bolam T & Sheahan D (2013) Ocean acidification increases the toxicity of contaminated sediments. *Glob Chang Biol* 19:340–351.
- Rocha ML, Sa F, Campos MS, Grassi MT, Combi T & Machado E da C (2017) Metals impact into the Paranaguá Estuarine Complex (Brazil) during the exceptional flood of 2011. *Brazilian J Oceanogr* 65:54–68.
- Rodríguez-Ramírez A, Bastidas C, Cortés J, Guzmán H, Leão Z, Garzón-Ferreira J, Kikuchi R, Pandovani Ferreira B, Alvarado JJ, Jiménez C, Fonseca AC & Salas E (2008) Status of Coral Reefs and associated ecosystems in Southern Tropical America: Brazil, Colombia, Costa Rica, Panamá and Venezuela. In: *Status of Coral Reefs of the World*. pp. 281–294.
- Santos AS (2013) Concentração de clorofila-a fracionada e nutrientes inorgânicos dissolvidos na plataforma continental da Bahia.
- Scherner F, Pereira CM, Duarte G, Horta A, Barreira C, Barufi JB & Maria S (2016)

- Effects of ocean acidification and temperature increases on the photosynthesis of tropical reef calcified macroalgae. *PLoS One* 11.
- Schmidt C, Heinz P, Kucera M & Uthicke S (2011) Temperature-induced stress leads to bleaching in larger benthic foraminifera hosting endosymbiotic diatoms. *Limnol Oceanogr* 56:1587–1602.
- Schmidt C, Kucera M & Uthicke S (2014) Combined effects of warming and ocean acidification on coral reef Foraminifera *Marginopora vertebralis* and *Heterostegina depressa*. *Coral Reefs* 33:805–818.
- Seoane JCS, Arantes RCM & Castro CB (2012) Benthic habitat mapping at Recife de Fora, Brazil: imagery and GIS. In: *Proceedings of the 12th International Coral Reef Symposium*. Cairns, Australia. pp. 1–5.
- Siddiqui S & Bielmyer-Fraser GK (2015) Responses of the sea anemone, *Exaiptasia pallida*, to ocean acidification conditions and copper exposure. *Aquat Toxicol* 167:228–239.
- Silva ACR de S (2016) Hidrodinâmica do estuário do rio Buranhem, Porto Seguro - Bahia.
- Silva CSE, Novais SC, Simões T, Caramalho M, Gravato C, Rodrigues MJ, Maranhão P & Lemos MFL (2018) Using biomarkers to address the impacts of pollution on limpets (*Patella depressa*) and their mechanisms to cope with stress. *Ecol Indic* 95:1077–1086.
- Stewart RI, Dossena M, Bohan DA, Jeppesen E, Kordas RL, Ledger ME, Meerhoff M, Moss B, Mulder C, Shurin JB, Suttle B, Thompson R, Trimmer M & Woodward G (2013) Mesocosm experiments as a tool for ecological climate-change research, 1st ed. Elsevier Ltd.
- Stuhr M, Reymond CE, Rieder V, Hallock P, Westphal H & Kucera M (2017) Reef calcifiers are adapted to episodic heat stress but vulnerable to sustained warming. *PLoS One* 12:1–20.
- Takesue RK & Storlazzi CD (2017) Sources and dispersal of land-based runoff from small Hawaiian drainages to a coral reef: Insights from geochemical signatures. *Estuar Coast Shelf Sci* 188:69–80.
- Tkachenko KS (2017) Coral reefs in the face of ecological threats of the 21st century. *Biol Bull Rev* 7:64–83.

- Toyofuku T, Matsuo MY, de Nooijer LJ, Nagai Y, Kawada S, Fujita K, Reichart G-J, Nomaki H, Tsuchiya M, Sakaguchi H & Kitazato H (2017) Proton pumping accompanies calcification in foraminifera. *Nat Commun* 8:14145.
- Tresguerres M (2016) Novel and potential physiological roles of vacuolar-type H⁺ - ATPase in marine organisms. *J Exp Biol* 219:2088–2097.
- Uthicke S, Fabricius K, De'ath G, Negri A, Smith R, Warne M, Noonan S, Johansson C, Gorsuch H & Anthony K (2016) Multiple and cumulative impacts on the GBR: assessment of current status and development of improved approaches for management: Final Report Project 1.6. Cairns, Australia.
- van Dam JW, Negri AP, Mueller JF, Altenburger R & Uthicke S (2012a) Additive pressures of elevated sea surface temperatures and herbicides on symbiont-bearing foraminifera. *PLoS One* 7:1–12.
- van Dam JW, Negri AP, Mueller JF & Uthicke S (2012b) Symbiont-specific responses in foraminifera to the herbicide diuron. *Mar Pollut Bull* 65:373–83.
- van Dam JW, Negri AP, Uthicke S & Mueller JF (2011) Chemical pollution on coral reefs: Exposure and ecological effects. In: *Ecological impacts of toxic chemicals*. F. Sanchez-Bayo, P.J. van den Brink & R.M. Mann (eds). Bentham Science Publishers: Amsterdam, Netherlands. pp. 187–211.
- van Dam JW, Uthicke S, Beltran VH, Mueller JF & Negri AP (2015) Combined thermal and herbicide stress in functionally diverse coral symbionts. *Environ Pollut* 204:271–279.
- Verbruggen H, Clerck O De, Yeurt ADRN, Spalding HL & Vroom PS (2006) Phylogeny and taxonomy of *Halimeda incrassata*, including descriptions of *H. kanaloana* and *H. heteromorpha* spp. nov. (Bryopsidales, Chlorophyta). *Eur J Phycol* 41:337–362.
- Veron JEN (2011) Ocean Acidification and Coral Reefs: An Emerging Big Picture. *Diversity* 3:262–274.
- Veron JEN, Hoegh-Guldberg O, Lenton TM, Lough JM, Obura DO, Pearce-Kelly P, Sheppard CRC, Spalding M, Stafford-Smith MG & Rogers a D (2009) The coral reef crisis: the critical importance of <350 ppm CO₂. *Mar Pollut Bull* 58:1428–36.
- Vieira CED, Costa PG, Caldas SS, Tesser ME, Risso WE, Escarrone ALV, Primel EG, Bianchini A & Martinez CB dos R (2019) An integrated approach in subtropical

- agro-ecosystems: Active biomonitoring, environmental contaminants, bioaccumulation, and multiple biomarkers in fish. *Sci Total Environ* 666:508–524.
- Vogel N, Fabricius KE, Strahl J, Hamilton S, Noonan C, Wild C & Uthicke S (2015a) Calcareous green alga *Halimeda* tolerates ocean acidification conditions at tropical carbon dioxide seeps. *Limnol Oceanogr*:263–275.
- Vogel N, Meyer FW, Wild C & Uthicke S (2015b) Decreased light availability can amplify negative impacts of ocean acidification on calcifying coral reef organisms. *Mar Ecol Prog Ser* 521:49–61.
- Volkman JK (1986) A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org Geochem* 9:83–99.
- Wilkinson AD, Collier CJ, Flores F, Langlois L, Ralph PJ & Negri AP (2017) Combined effects of temperature and the herbicide diuron on Photosystem II activity of the tropical seagrass *Halophila ovalis*. *Sci Rep* 7:45404:1–11.
- Wood CM, Farrel AP & Brauner CJ (2012) Fish physiology: Homeostasis and toxicology of essential metals, Volume 31A.
- Wood CM, Farrel AP & Brauner CJ (2011) Fish physiology: Homeostasis and toxicology of non-essential metals, Volume 31B.
- Zilberberg C, Abrantes DP, Marques JA, Machado LF & Marangoni LF de B (2016) Conhecendo os recifes brasileiros: rede de pesquisas Coral Vivo. C. Zilberberg, D.P. Abrantes, J.A. Marques, L.F. Machado & L.F. de B. Marangoni (eds). Serie Livros Museu Nacional: Rio de Janeiro.
- Zou D & Gao K (2013) Thermal acclimation of respiration and photosynthesis in the marine macroalga *Gracilaria lemaneiformis* (Gracilariales, Rhodophyta). *J Phycol* 49:61–68.

8. ANEXOS

8.1. Anexo I. BIOINDICADORES E BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DE IMPACTOS EM RECIFES DE CORAL

Este anexo se refere a um capítulo de livro publicado em 2016 no livro “Conhecendo os Recifes Brasileiros: Rede de Pesquisas Coral Vivo”, Série Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro, editado por Zilberberg, C., Abrantes, D.P., Marques, J.A., Machado, L.F., e Marangoni, L.F. de B..

Bioindicadores e biomarcadores para avaliação de impactos em recifes de coral

Joseane A. Marques, Laura F. B. Marangoni, Adalto Bianchini

Para *preservar* os recifes de coral é preciso conhecê-los. Também é essencial identificar os principais estressores que ameaçam o equilíbrio ambiental desse ecossistema e encontrar formas de monitorar sua saúde. O presente capítulo abordará algumas ferramentas para avaliar e monitorar impactos, principalmente aqueles relacionados a mudanças climáticas e à poluição marinha, em organismos de ambientes recifais. Essas ferramentas podem auxiliar de forma significativa no estabelecimento de estratégias de preservação.

Recifes em declínio

Apesar de sua grande importância, 70% dos recifes de coral do mundo estão em processo de degradação. No Brasil, estima-se que 50% deles estejam ameaçados por atividades humanas. Considerando a gravidade do declínio da qualidade desses ecossistemas e sua importância ecológica, é necessário monitorar seu **estado de saúde**. Muitos países reconhecem essa necessidade e possuem programas nacionais de monitoramento da qualidade de ambientes recifais. Por exemplo, o Instituto Australiano de Ciências Marinhas (AIMS) monitora os recifes da Grande Barreira de Corais da Austrália há 20 anos. A Agência Americana dos Oceanos e do Clima (NOAA) conta com um departamento voltado para a avaliação e o monitoramento de recifes de coral, o Programa de Conservação de Recifes de Coral (NOAA-CRCP), atuante desde 2000. No Brasil, a primeira ação de larga escala para o monitoramento de recifes ocorreu apenas em 2002, com o projeto “Monitoramento dos Recifes de Coral do Brasil”, financiado pelo Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira – Ministério do Meio Ambiente (PROBIO-MMA). Esses programas são úteis para compreender a dinâmica e a variabilidade natural dos



1. IPCC. 2014. *The Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. Cambridge, UK. Disponível em: <<https://www.ipcc.ch/report/ar5/>>. Acesso em: janeiro 2016.

recifes, conhecer melhor sua ecologia e detectar respostas a impactos antrópicos. As informações obtidas são essenciais para identificar locais ameaçados pela degradação, bem como para planejar ações políticas voltadas ao manejo e à conservação desse ecossistema.

Principais causas do declínio dos recifes

As potenciais causas do declínio da qualidade ambiental observado nos recifes de coral devem ser identificadas e monitoradas. Estudos recentes mostram que os recifes estão sendo afetados por impactos de escala global e local.

Impactos globais

O aquecimento da superfície e a acidificação dos oceanos são os impactos globais com maior potencial para afetar os recifes de coral. Esses fenômenos são causados, principalmente, pelo aumento global da emissão atmosférica de gás carbônico (CO₂), como exposto pelo recente relatório do Painel Intergovernamental de Mudanças Climáticas (IPCC)¹.

Impactos locais

Dentre os impactos que podem ocorrer de forma localizada, neste capítulo é ressaltada a poluição marinha associada a compostos químicos. Os poluentes químicos que chegam aos recifes de coral podem ter fontes pontuais ou difusas, e podem ser transportados por longas distâncias – sendo a drenagem continental a principal rota de transporte de poluentes que chegam aos recifes. Atividades humanas, como agricultura, pecuária e navegação, assim como o despejo direto ou indireto de esgoto doméstico e industrial, são as principais fontes de poluentes químicos para a zona costeira. Metais, pesticidas, hidrocarbonetos e excesso de nutrientes são os poluentes mais comumente encontrados em recifes de coral.

Ferramentas de avaliação e monitoramento

A necessidade de se avaliar a condição de saúde dos ambientes naturais para a tomada de decisões com relação ao uso e conservação de ecossistemas estimula a busca por **ferramentas** de avaliação que sejam práticas, adequadas e de baixo custo.

Parâmetros abióticos e bióticos

Alterações na qualidade da água podem ser identificadas e monitoradas de forma direta através da análise de parâmetros abióticos. Nesse caso, parâmetros **abióticos** são medidas ou características relacionadas às propriedades físico-químicas da água, como temperatura, pH, salinidade e concentração de nutrientes inorgânicos. Cabe ressaltar que cada ambiente ou local em particular possui um nível de qualidade da água necessário para a manutenção de suas funções ecológicas, o que implica em características abióticas específicas. Variações nessas características, mais intensas ou de maior duração que as variações naturais de um determinado local, indicam uma condição ambiental alterada. Com relação à presença de contaminantes químicos, esses podem ser diretamente medidos na água ou no sedimento. A legislação brasileira prevê os limites máximos para muitos contaminantes na água e sedimento marinho, por meio das Resoluções CONAMA 357², de 2005, e CONAMA 344³, de 2004, respectivamente. Os valores estabelecidos nessa legislação representam os limites para a “manutenção da qualidade ambiental necessária para sustentação do ecossistema” e são extremamente importantes para orientar as políticas ambientais.

Como visto anteriormente, conhecer as características físico-químicas e os níveis dos contaminantes químicos em determinado ambiente é de extrema importância. Porém, essa informação por si só não caracteriza um impacto na biota residente. Logo, para avaliar e quantificar, por exemplo, o impacto do aquecimento e da redução do pH da água, ou até mesmo a presença de determinado poluente⁴, é necessário detectar e quantificar os **efeitos** desses agentes estressores **sobre a biota**.

2. D.O.U. 2005. Resolução CONAMA nº 357. *Diário Oficial da União*, n.053, de 18 de março de 2005, p.58-63. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: janeiro 2016.

3. D.O.U. 2004. Resolução CONAMA nº 344. *Diário Oficial da União*, n.087, de 7 de maio de 2004, p.56-57. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=445>>. Acesso em: janeiro 2016.

4. Para entender melhor a diferença entre poluente e contaminante, ver CORREIA et al. (2016), capítulo 12 deste volume.

5. MOORE, M.N.; DEPLEDGE, M.H.; READMAN, J.W.; LEONARD, D.R.P. 2004. *Mutation Research*, 552:247-268.

Efeitos na biota: níveis de organização biológica

Os seres vivos podem ser estruturados em níveis de organização biológica, seguindo uma ordem crescente de complexidade, desde o nível molecular, celular, tecidual, sistêmico e organizmico, até o nível populacional, comunitário e ecossistêmico.

Uma condição ambiental alterada, seja pelo aumento de temperatura atípico ou pela presença de um agente tóxico, pode causar efeito em todos os níveis de organização biológica mencionados. No entanto, existe uma hierarquia de respostas (Figura 1), de forma que, inicialmente, o estressor provoca alterações nos níveis bioquímicos e celulares. Se o estressor em questão possuir alta intensidade ou agir por um longo período de tempo, e os organismos não forem capazes de manter sua homeostase através de alterações moleculares/bioquímicas/celulares, ocorrerão alterações em processos fisiológicos, afetando funções vitais, como o crescimento e a reprodução. Se essa “cascata de reações” continuar, devido à frequência e/ou intensidade do agente estressor ou à “baixa capacidade” do organismo em lidar com o impacto, os indivíduos podem desenvolver doenças ou até mesmo chegar à morte. Caso o estressor continue a atuar, o nível seguinte a sofrer alterações é o populacional. Por sua vez, alterações populacionais podem induzir a um desequilíbrio da comunidade da qual a espécie afetada participa. Alterações em comunidades podem, dependendo da magnitude do impacto, levar a alterações em todo o ecossistema envolvido.

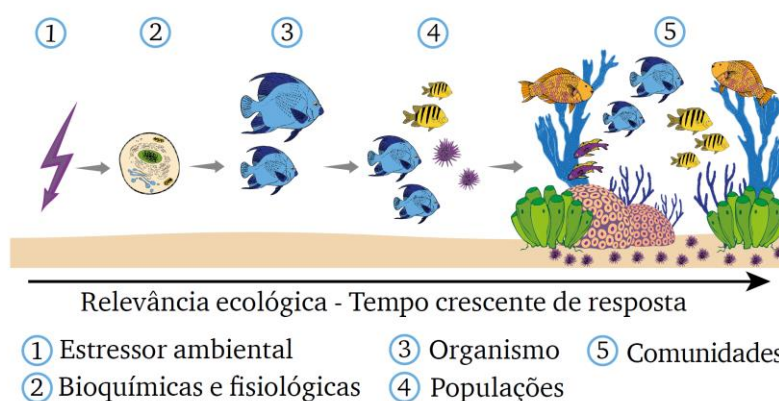


Figura 1. Representação esquemática da ordem de respostas a estressores ambientais ao longo dos níveis de organização biológica. Adaptado de MOORE et al. (2004)⁵.

As alterações nos níveis mais altos de organização biológica, ou seja, em comunidades ou ecossistemas, têm relevância ecológica muito maior do que “simples” alterações celulares, as quais podem ou não gerar efeitos nos níveis mais altos de organização biológica. Por isso, a maioria dos programas de monitoramento tem como alvo esse tipo de resposta, monitorando, por exemplo, a densidade de peixes, a cobertura ou número de espécies de coral, ou ainda a quantidade de colônias de coral branqueadas.

6. Absorção e retenção de substâncias químicas no organismo.

Bioindicadores

Os bioindicadores constituem uma abordagem muito utilizada para avaliar e monitorar impactos em ambientes aquáticos. De forma geral, bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas cuja presença, abundância e condições são indicativos biológicos de uma determinada condição ambiental.

Espécies indicadoras em ecossistemas recifais

Cada bioindicador tem um tempo de resposta e algum grau de especificidade com relação às alterações na qualidade da água. A escolha final do bioindicador a ser empregado depende do objetivo específico e do prazo, ou período de tempo, disponível para realizar o monitoramento em questão. Por exemplo, para monitorar os níveis dos contaminantes acumulados nos organismos, é mais interessante escolher uma espécie que tenha biologia bem conhecida e seja capaz de *bioacumular*⁶ os compostos em análise. Bivalves e macroalgas são frequentemente utilizados nesses casos, pois estão em contato com as fases particulada e dissolvida dos poluentes na água, respectivamente. Essas espécies, capazes de refletir com segurança os níveis ambientais de contaminantes em seus próprios tecidos, são também conhecidas como *biomonitoras*.

De forma geral, para avaliar os efeitos biológicos de impactos em recifes, os próprios corais construtores desse ecossistema, algumas espécies de macroalgas e muitas esponjas são utilizadas como bioindicadores. Sua presença, ausência, proporção ou alterações populacionais são

utilizadas para avaliar e monitorar a existência de impactos antrópicos em comunidades recifais. O tipo de impacto (agudo ou crônico) e o tempo de monitoramento (semanas a anos) devem ser considerados na escolha do bioindicador adequado. Geralmente, espécies sésseis se mostram como bioindicadores mais apropriados para detectar impactos, uma vez que, devido a seu hábito de vida, elas não poderão evitar as condições ambientais desfavoráveis por meio de fuga, assim refletindo com maior fidelidade o estado de seu local de ocorrência.

Foraminíferos como bioindicadores da qualidade ambiental de recifes de coral

Considerando que as espécies chave de ambientes recifais têm, de forma geral, um ciclo de vida relativamente longo (corais, hidrocorais, peixes e algumas algas calcárias), a velocidade de resposta de suas populações a impactos ambientais pode ser lenta. Uma vez que essas espécies geralmente são cruciais na conservação do ecossistema, seria interessante detectar os impactos antes que eles causem alterações sérias nessas populações.

Os foraminíferos são organismos unicelulares com uma pequena concha de carbonato de cálcio, sendo comumente utilizados como bioindicadores de qualidade ambiental. Muitas das espécies que vivem em ambiente recifal compartilham algumas características fisiológicas com os corais. Esses foraminíferos, além de produzirem um esqueleto (chamado testa) de carbonato de cálcio, também fazem simbiose com microalgas. Por isso, esses pequenos organismos possuem importantes características fisiológicas em comum com corais zooxantelados e, consequentemente, muitos requerimentos fisiológicos semelhantes. Eles também podem branquear em resposta a situações estressantes e até mesmo ter seu crescimento/calcificação prejudicado pelos mesmos estressores que afetam os corais. No caso dos foraminíferos, a vantagem é que esses organismos têm um ciclo de vida bem mais curto e respondem mais rapidamente aos impactos ambientais, constituindo assim uma ferramenta eficiente para antecipar efeitos deletérios no ecossistema como um todo.

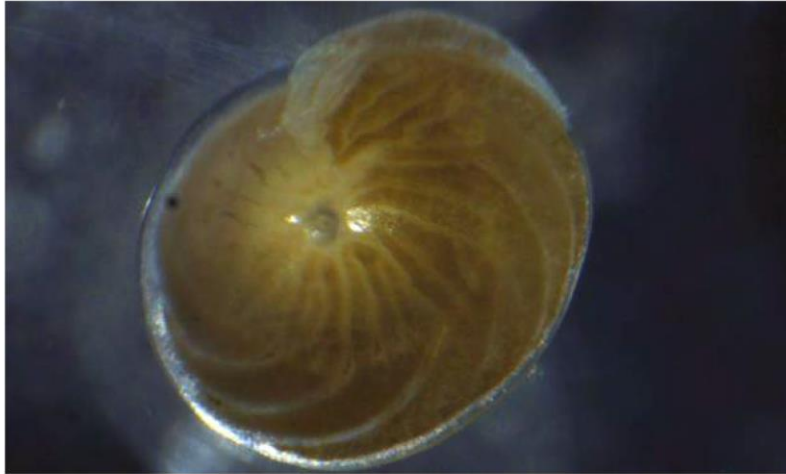


Figura 2. Foraminífero do gênero *Amphistegina*, organismo comumente usado como bioindicador da qualidade ambiental em recifes de coral. Crédito: Martina Prazeres.

Biomarcadores: uma abordagem inovadora

De forma geral, respostas em nível de população e comunidade possuem alta relevância ecológica. No entanto, são mais difíceis de serem interpretadas, uma vez que tornam mais complexa a distinção das alterações associadas à variabilidade natural (estações do ano, fenômeno El Niño, período reprodutivo, etc.) dos efeitos diretos causados pelo estressor ambiental. Além do mais, essas respostas só são detectáveis e mensuráveis após um tempo considerável de exposição, quando a intensidade do estressor é baixa, ou após a exposição aguda a uma alta intensidade do agente estressor. Assim, quando uma alteração significativa é evidenciada, o ecossistema já poderá se encontrar severamente comprometido. Neste contexto, o uso de **biomarcadores** como ferramentas de avaliação e monitoramento da qualidade ambiental e do ecossistema apresenta inúmeras vantagens.

Biomarcadores são alterações biológicas em **nível molecular, celular, fisiológico e/ou comportamental** que expressam a exposição e os efeitos subletais induzidos por contaminantes ou condições ambientais alteradas. Como as respostas nesses níveis de organização biológica

7. Processo que busca eliminar ou reduzir a atividade de substâncias químicas “indesejadas”, assim como aumentar ou possibilitar sua excreção.

ocorrem em uma escala de tempo significativamente menor que aquelas observadas nos níveis mais altos, os biomarcadores servem como **sinais de aviso prévio** da degradação em comunidades e ecossistemas.

Considerando, como exemplo, que o dano na comunidade biológica seja a morte de um indivíduo diabético, é possível monitorar se a pessoa em avaliação está “sofrendo impacto” do diabetes observando os sintomas diretos da doença (cegueira ou dificuldade de cicatrização). Porém, quando esses sintomas são detectáveis, a pessoa já está severamente “impactada”. Por outro lado, ao monitorar os níveis sanguíneos da glicose, pode-se antecipar o desenvolvimento ou o agravamento da doença. Portanto, o uso de biomarcadores para monitorar níveis “mais baixos” da organização biológica funciona como uma **ferramenta preditiva** da degradação ambiental. Exemplos de biomarcadores incluem a expressão de genes e a atividade de enzimas relacionadas ao metabolismo, crescimento, detoxificação⁷, estresse oxidativo e proteínas de estresse, entre outros.

Apesar da vantagem de funcionar como ferramenta tanto de avaliação e monitoramento como de previsão, essa abordagem apresenta algumas limitações. Primeiramente, o custo das análises geralmente é elevado, comparado ao monitoramento de comunidades. Dependendo da espécie que se escolhe monitorar, a amostragem pode ou não ser destrutiva (causar a morte do organismo). Fatores endógenos (período reprodutivo, idade, etc.) e exógenos (salinidade, temperatura, etc.) também podem alterar a resposta dos biomarcadores. De forma geral, assim como no monitoramento de espécies bioindicadoras, é importante conhecer a variabilidade natural dessas respostas para que se possa efetivamente identificar as alterações relacionadas aos impactos ambientais. Essa abordagem costuma ser criticada pela dificuldade de se relacionar as alterações em níveis mais baixos de organização biológica àquelas que ocorreriam em populações e comunidades. Contudo, trabalhos recentes, principalmente com organismos recifais, têm mostrado claramente que respostas de biomarcadores estão fortemente relacionadas a efeitos fisiológicos, doenças e alterações em populações. A condição de estresse

oxidativo, por exemplo, está diretamente relacionada ao branqueamento de corais⁸. Parâmetros relacionados a essa condição são utilizados como biomarcadores celulares de impactos diversos. No caso de corais e foraminíferos com endossimbiontes, essa alteração em nível celular induz alterações em nível fisiológico e populacional, uma vez que eventos de branqueamento em grande escala muitas vezes estão associados à mortalidade em massa. Com relação ao processo de calcificação – outro importante indicador de saúde dos recifes de coral –, qualquer impacto que o perturbe pode ser antecipado pela análise de parâmetros moleculares e bioquímicos, como, por exemplo, a atividade da enzima Ca^{2+} -ATPase⁵.

8. Para mais detalhes sobre estresse oxidativo, branqueamento e calcificação em corais, ver MARANGONI et al. (2016), capítulo 4 deste volume.

Biomarcadores e os efeitos de poluentes

Nas últimas décadas, o número de estudos que utilizam biomarcadores para avaliar o efeito de poluentes é crescente. Parâmetros associados ao estresse oxidativo (defesas antioxidantes ou medidas de dano oxidativo em biomoléculas) são alguns dos biomarcadores mais utilizados, em combinação com a avaliação de proteínas de detoxificação (p.ex.: monooxygenases e metalotioneínas).

A contaminação química por metais e por compostos orgânicos, como herbicidas e hidrocarbonetos, é um problema significativo para os recifes de coral. A exposição a esses contaminantes é capaz de alterar o desempenho fisiológico de cnidários, como os corais e as anêmonas, alterando, por exemplo, a capacidade antioxidante do organismo e aumentando o nível de oxidação em biomoléculas. Isso se dá, basicamente, pela “geração” de maior quantidade de espécies ativas do oxigênio (EAO) na presença de metais ou durante processos de eliminação ou biotransformação dos contaminantes. Para eliminar o excesso de EAO, o organismo aciona suas defesas antioxidantes. Caso não seja suficiente, as EAO podem causar dano oxidativo em lipídios, proteínas e DNA. Por exemplo, a bióloga Martina Prazeres, juntamente com o professor Adalto Bianchini e seus colaboradores, identificou uma forte relação entre a ocorrência de dano oxidativo, a ativação de defesas antioxidantes e o branqueamento de foraminíferos com

9. PRAZERES, M.D.F.; MARTINS, S.E.; BIANCHINI, A. 2012. *Journal of Foraminiferal Research*, 42:56-65.

10. MARANGONI, L.F.B. 2014. *Biomarcadores para avaliação dos efeitos do cobre no coral *Mussismilia harttii* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae)*. 86p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, Brasil.

endossimbionte em recifes contaminados por metais em Fernando de Noronha (PE, Brasil)⁹. Além disso, esses mesmos recifes mostraram baixa densidade populacional de foraminíferos com endossimbionte, confirmando a relação direta entre as respostas bioquímicas observadas e os danos diretos na comunidade de foraminíferos.

Com o apoio da Rede de Pesquisas Coral Vivo, através de experimentos ecotoxicológicos realizados no Mesocosmo Marinho em Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, BA, Brasil), observou-se uma capacidade antioxidante reduzida e danos oxidativos no DNA do coral brasileiro *Mussismilia harttii* após exposição ao cobre, contaminante muito comum no ambiente marinho¹⁰. Tal estudo também identificou que a enzima anidrase carbônica é um biomarcador bioquímico de alta relevância ecológica, devido a seu papel na fotossíntese das zooxantelas e na calcificação do coral, podendo ser usado para detectar o impacto da exposição aguda a metais. No caso de uma exposição mais longa a metais, pode-se detectar alterações na atividade da Ca^{2+} -ATPase (enzima relevante no processo de calcificação) em *M. harttii*. É importante salientar que alterações nesses biomarcadores foram detectadas sem que esses corais apresentassem qualquer sinal visual de branqueamento ou debilidade, o que reforça sua aplicação como ferramenta preditiva.

Biomarcadores e os efeitos de mudanças climáticas globais

A abordagem dos biomarcadores celulares tem sido usada classicamente para avaliar efeitos da poluição marinha. Considerando a crescente preocupação no que se refere às mudanças climáticas, tem se intensificado a busca por biomarcadores apropriados para se monitorar também os impactos globais.

Muitos autores têm estudado principalmente a atividade de enzimas e a expressão de genes envolvidos na calcificação, fotossíntese e metabolismo de holobiontes. Pesquisadores em diversas partes do mundo vêm identificando algumas proteínas como potenciais biomarcadores de aquecimento global e acidificação marinha, como a RuBisCO (enzima essencial para a fotossíntese), e outras relacionadas ao metabolismo energético e à calcificação em corais e foraminíferos.

No Brasil, pesquisas sobre a resposta de biomarcadores a impactos globais (acidificação dos oceanos e aumento de temperatura) em ambiente recifal estão sendo desenvolvidas pelo grupo de pesquisa do professor Adalto Bianchini com o apoio da Rede de Pesquisas Coral Vivo. Estudos recentes indicam o potencial de enzimas relacionadas à calcificação (Ca^{2+} -ATPase e Mg^{2+} -ATPase) para a avaliação e o monitoramento de efeitos da acidificação marinha em foraminíferos com endossimbionte¹¹, assim como sua interação com a contaminação por cobre. Biomarcadores relacionados aos processos de calcificação e fotossíntese, associados ao monitoramento do branqueamento, têm, portanto, um elevado potencial de aplicação na avaliação e monitoramento da saúde de organismos recifais frente a um oceano em transformação, bem como de prevenção/antecipação de efeitos nocivos em comunidades e ecossistemas recifais.

Perspectivas

Os estudos em desenvolvimento no âmbito da Rede de Pesquisas Coral Vivo pretendem, portanto, contribuir para elucidar os efeitos de impactos globais, como a acidificação marinha e o aumento da temperatura superficial da água, em parâmetros do estresse oxidativo e do metabolismo energético, assim como em parâmetros bioquímicos relacionados à calcificação em espécies recifais brasileiras. Além disso, um dos grandes objetivos é conhecer os efeitos de múltiplos estressores, locais e globais, como a contaminação por metais e sua interação com a temperatura e o pH da água do mar na fisiologia de corais, hidrocorais e foraminíferos com endossimbionte. A partir dos resultados obtidos, será possível entender como a interação entre esses agentes estressores afetam a fisiologia de espécies chave, e como isso pode afetar as comunidades recifais como um todo. Ao identificar os biomarcadores mais adequados para **detectar** e **monitorar** possíveis efeitos prejudiciais em comunidades, será possível fornecer subsídios para políticas de conservação e programas de avaliação e monitoramento da qualidade ambiental em recifes de coral brasileiros.

11. MARQUES, J.A. 2014. *Resposta de biomarcadores em Amphistegina spp. (Amphisteginidae, Foraminifera) expostos ao cobre e acidificação marinha*. 80p. Dissertação (Mestrado em Oceanografia Biológica) - Universidade Federal do Rio Grande. Rio Grande, RS, Brasil.



Literatura recomendada

DOWNS, C.A.; FAUTH, J.E.; ROBINSON, C.E.; CURRY, R.; LANZENDORF, B.; HALAS, J.C.; HALAS, J.; WOODLEY, C.M. 2005. Cellular diagnostics and coral health: Declining coral health in the Florida Keys. *Marine Pollution Bulletin*, 51:558-569.

HALLOCK, P.; LIDZ, B.H.; COCKEY-BURKHARD, E.M.; DONNELLY, K.B. 2003. Foraminifera as bioindicators in coral reef assessment and monitoring: the FORAM Index. *Environmental Monitoring and Assessment*, 81:221-238.

VAN DAM, J.W.; NEGRI, A.P.; UTHICKE, S.; MUELLER, J.F. 2011. Chemical Pollution on Coral Reefs: Exposure and Ecological Effects. p.187-211 in SANCHEZ-BAYO, F.; VAN DEN BRINK, P.J.; MANN, R.M. (Eds) *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Amsterdam: Bentham Science Publishers.

8.2. Anexo II. QUALIDADE AMBIENTAL EM RECIFES DE CORAL DO ATLÂNTICO SUDOESTE: INDICADORES GEOQUÍMICOS, DE QUALIDADE DA ÁGUA E ECOLÓGICOS.

Este capítulo se refere a um artigo publicado na revista *Science of the Total Environment* (versão online disponível em setembro de 2018 - DOI: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.154).



Environmental health in southwestern Atlantic coral reefs: Geochemical, water quality and ecological indicators

Joseane A. Marques^{a,b,*}, Patricia G. Costa^c, Laura F.B. Marangoni^{a,b}, Cristiano M. Pereira^{b,d}, Douglas P. Abrantes^d, Emiliano N. Calderon^{b,e}, Clovis B. Castro^{b,f}, Adalto Bianchini^{b,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS 96203900, Brazil

^b Instituto Coral Vivo, Rua dos Coqueiros, 87, Santa Cruz Cabralia, BA 45807000, Brazil

^c Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS 96203900, Brazil

^d Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ/UFRJ), Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ 20940040, Brazil

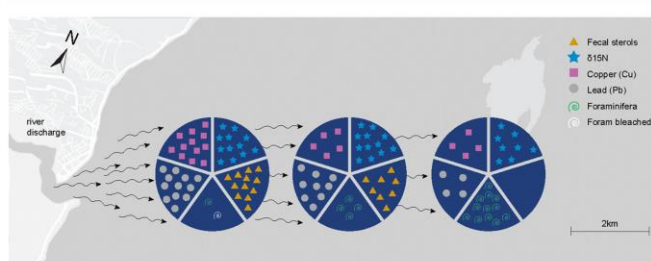
^e Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Conservação, Universidade Federal do Rio de Janeiro (NUPEM/UFRJ), Av. São José do Barreto, s/n, Macaé, RJ 27971550, Brazil

^f Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro (MNRJ/UFRJ), Quinta da Boa Vista, Rio de Janeiro, RJ 20940-040, Brazil

HIGHLIGHTS

- Runoff and pollution effects are understudied in South Atlantic coral reefs.
- Isotopes, sterols and metal levels indicated sewage contamination near the coast.
- Alterations in *Amphistegina* populations indicated detrimental ecological effects.
- Foraminifera as bioindicators of impacts of river influence
- Multidisciplinary indicators used are effective tools to assess reefs health.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2018

Received in revised form 19 August 2018

Accepted 12 September 2018

Available online 13 September 2018

Editor: Kevin V. Thomas

Keywords:

Marine pollution

Runoff

Metals

Sewage

Symbiont-bearing foraminifera

ABSTRACT

Climate change, pollution and increased runoff are some of the main drivers of coral reefs degradation worldwide. However, the occurrence of runoff and marine pollution, as well as its ecological effects in South Atlantic coral reefs are still poorly understood. The aim of the present work is to characterize the terrigenous influence and contamination impact on the environmental health of five reefs located along a gradient of distance from a river source, using geochemical, water quality, and ecological indicators. Stable isotopes and sterols were used as geochemical indicators of sewage and terrigenous organic matter. Dissolved metal concentrations (Cu, Zn, Cd, and Pb) were used as indicators of water quality. Population density, bleaching and chlorophyll α content of the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina gibbosa*, were used as indicators of ecological effects. Sampling was performed four times during the year to assess temporal variability. Sediment and water quality indicators showed that reefs close to the river discharge experience nutrient enrichment and sewage contamination, and metals concentrations above international environmental quality guidelines. Higher levels of contamination were strongly related to the higher frequency of bleaching and lower density in *A. gibbosa* populations. The integrated evaluation of stable isotopes, sterols and metals provided a consistent diagnostic about sewage influence on the studied reefs. Additionally, the observed bioindicator responses evidenced relevant ecological effects. The water quality, geochemical and ecological indicators employed in the present study were effective as biomonitoring tools to be applied in reefs worldwide.

© 2018 Published by Elsevier B.V.

* Corresponding author at: Universidade Federal do Rio Grande – FURG, Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96203900, Rio Grande, RS, Brazil.
E-mail address: jmarques.oceano@gmail.com (J.A. Marques).

1. Introduction

Human activities have reduced the environmental quality of marine ecosystems worldwide (Wilkinson, 2008). Coral reefs are highly productive and valuable ecosystems which are being severely affected by anthropogenic stressors at global and local scales (Ban et al., 2014; Hoegh-Guldberg, 2014; Wilkinson, 2008). Climate change, overfishing, pollution, and increased runoff due deforestation and urban development are some of the main drivers of degradation of coral reefs worldwide (Birkeland, 2015; Norstrom et al., 2016).

Rivers are the main sources of terrigenous sediment, nutrients and contaminants to inshore reefs (van Dam et al., 2011). A huge effort has been employed to assess the ecological effects of sediment and contaminant runoff in coral reef areas, such as the Caribbean and Great Barrier Reef. Also, strategies to minimize the loads of terrigenous material to these fragile ecosystems have been developed (Bartley et al., 2014; Brodie et al., 2017; Takesue et al., 2009; Takesue and Storlazzi, 2017). Nevertheless, the effects of runoff in South Atlantic reefs are poorly understood. Moreover, southwestern Atlantic reefs are naturally exposed to higher levels of terrigenous sediment compared to Caribbean and Indo-Pacific reefs (Castro et al., 2012; Castro and Pires, 2001; Leão et al., 2003; Rodríguez-Ramírez et al., 2008). There is an overall lack of knowledge about water quality, as well as a poor description of the chemical contaminants affecting South Atlantic reefs. Characterization of water and sediment quality parameters in these reefs is an important step for scientific and management purposes. Also, the use of reliable bioindicators integrated with measurements of abiotic parameters increases the ecological relevance of environmental impact assessments.

Foraminifera, as well as corals and other reef-dwelling species, can be adversely affected by river-related environmental stress, including sedimentation, changes in quality of organic matter (Barbosa et al., 2016; Dessandier et al., 2015), sewage input and metal contamination (Emrich et al., 2017; Prazeres et al., 2012a). In fact, foraminifera are widely used as monitors of environmental changes, including a well-established application of foraminifera as bioindicators of coral reef water quality. Monitoring of symbiont-bearing species is particularly relevant, since they have similar physiological requirements to corals, which are the main reef builders, but respond faster to environmental changes (Barbosa et al., 2016; Cooper et al., 2009; Emrich et al., 2017; Hallock et al., 2003; Marques et al., 2017; Ross and Hallock, 2014). *Amphistegina* spp. are diatom-bearing foraminifera found abundantly in reefs worldwide (Langer and Hottinger, 2000), that have been considered as reliable bioindicators of anthropogenic impacts (Marques et al., 2017; Prazeres et al., 2016, 2012b; Ross and Hallock, 2014).

In light of the background above, the aim of the present study was to identify and characterize the impact of terrigenous influence and contamination on the environmental health of five South Atlantic reefs located along a gradient of distance from a river mouth, using geochemical (stable isotopes and sterol levels), water quality (metals concentrations) and ecological (foraminifera population density, bleaching frequency and chlorophyll α content) indicators. Carbon and nitrogen stable isotopes are effective tools to evaluate the source of organic matter, reflecting river-ocean gradients, as well as nutrient contamination and environmental quality status (Claudino et al., 2015; Jona-Lasinio et al., 2015). Furthermore, stable isotopes can be effectively applied in combination with other techniques (Carreira et al., 2015b; Cordeiro et al., 2018; Derrien et al., 2017). Many organic compounds, such as steroids and aliphatic hydrocarbons, also known as molecular biomarkers, have been successfully applied to trace sources of organic matter and sewage contamination (Derrien et al., 2017; Emrich et al., 2017; Martins et al., 2014). In turn, concentrations of metals such as Cu, Zn, Cd and Pb can indicate the presence of some human activities. Additionally, they are also used to assess environmental health, based on criteria established by water quality guidelines (Martins et al., 2012; Prazeres et al., 2012b; Rocha et al., 2017). Finally, ecological effects of environmental stressors can be evaluated by

assessing population and/or physiological responses in bioindicator species, such as the benthic foraminifera *Amphistegina* spp.

Our hypothesis is that markers of terrestrial influence and contamination, evaluated through stable isotopes, steroids and metals concentration, will be correlated with the distance between the reef and the river mouth, and will be related to lower *A. gibbosa* densities and higher bleaching frequency.

2. Material and methods

2.1. Study area

The Buranhém River is part of the largest hydrographic basin in southern region of the Bahia state (northeastern Brazil), flowing into the Atlantic Ocean at Porto Seguro coast (Sarmiento-Soares et al., 2008), one of the most touristic area in South America and an important area for reef conservation (Seoane et al., 2012). Along the 148 km of river course, there are diffuse sources of untreated sewage input, as well as several points of potential water contamination with pesticides and industrial waste. These environmental pressures are related to the unplanned urban occupation and land use in the area, which involves activities such as agriculture, eucalyptus forestry, cellulose pulp industry and the severe ongoing deforestation of the Atlantic Forest (Bomfim, 2012; Oberling et al., 2013; Santos, 2013; Silva, 2016).

Previous studies suggested a gradient of influence of the Buranhém River plume in the coral reefs of the *Parque Natural Municipal do Recife de Fora* (PNMRF) (Leite et al., 2018; Seoane et al., 2012). The PNMRF is a Marine Conservation Area located 8 km offshore from Porto Seguro city (Bahia state, northeastern Brazil), with a complex reef system (17.5 km²) composed mainly of sea grass beds, coralline algae, and corals (Seoane et al., 2012; Zilberberg et al., 2016).

The occurrence of an environmental quality gradient between reefs exposed to the Buranhém River plume was assessed by selecting five reef sites (S) between the river mouth area and the PNMRF region (Fig. 1). Three sampling sites were in reef patches outside the PNMRF [S1 (*Itassepocu Reef*): 16°26.0349'S–039°02.4140'W; S2 (*Pedra Carapindauba*): 16°25.7138'S–039°01.4990'W; and S3 (*Baixio Cerca*): 16°25.6938'S–039°00.4080'W]. The other two sampling sites were in reefs located inside the area of the marine park [S4 (*Recife de Fora-SW*): 16°25.0910'S–038°59.4502'W; and S5 (*Recife de Fora-NW*): 16°23.8428'S–038°59.0832'W]. Sampling was performed at the four different seasons in order to assess temporal variability (winter - August 2013; spring - December 2013; summer - February 2014; autumn - May 2014), carried out by scuba diving at mean depths of 5.9, 6.8, 7, 5.5 and 4 m for reefs 1, 2, 3, 4 and 5.

Air temperature and rainfall data during the period of study were acquired by an automatic station (code 86745) of the Brazilian National Institute of Meteorology (INMET) located in Porto Seguro (Bahia state, northeastern Brazil), and were expressed as daily means.

2.2. Collection methods

2.2.1. Sediment and seawater sampling

Sediment samples ($n = 3$, ~5 g of superficial sediment per sample) were collected and kept frozen (-80°C) until analysis. Seawater ($n = 3$ per sampling site at each season, 10 mL each sample) were collected, filtered (45 μm), acidified (1% HNO_3 final concentration), kept in the dark and frozen (-20°C) until analysis.

2.2.2. Foraminifera sampling

Pieces of reef rubble were manually collected at each sampling site, placed into labeled plastic bags ($n = 3$ per sampling site at each season) containing local seawater, transferred to the Coral Vivo Research facility at Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, Bahia state, northeastern Brazil), and scrubbed with small brushes to detach the associated sediment and fauna. Residues obtained were distributed in 150-mm Petri dishes

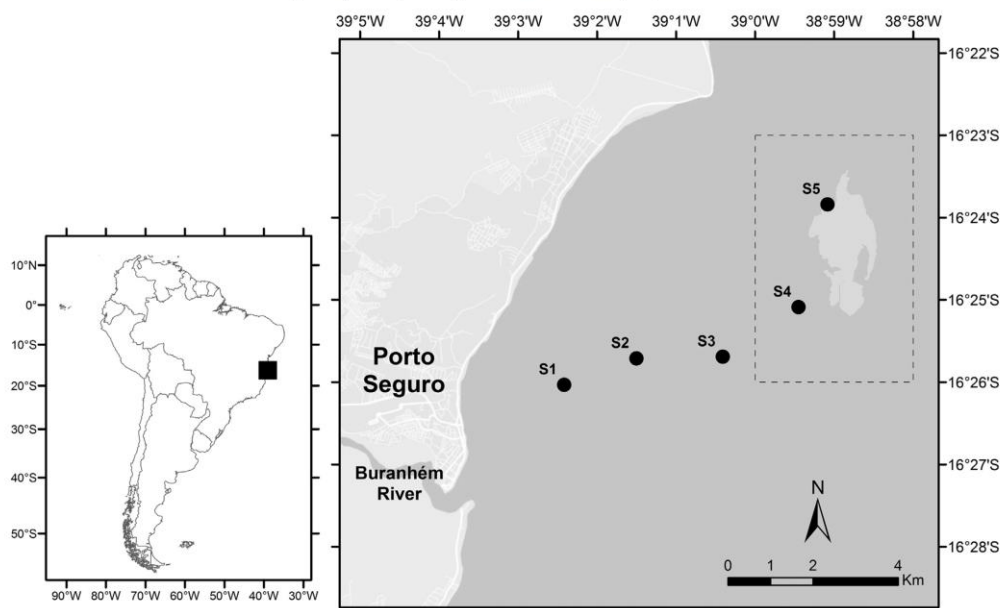


Fig. 1. Map showing the positions of the studied reef sites. Dashed square represents the area of the PNMRF.

containing seawater from the collection site, and sorted under stereomicroscope (Leica SD) for living *Amphistegina gibbosa* individuals.

2.3. Laboratory analysis

2.3.1. Carbon and nitrogen stable isotopes

Aliquots of sediment samples were dried (60 °C), ground to a fine powder with a mortar and pestle, weighed (~0.25 mg), and sent to Stable Isotope Core Laboratory (Washington State University) for determination of carbon and nitrogen stable isotopes values. For carbon stable isotope analysis, sample aliquots received acidification correction to remove inorganic carbon. Results were expressed in delta notation as $\delta^{13}\text{C}$ or $\delta^{15}\text{N}$ relative to Vienna Pee Dee Belemnite (VPDB) and atmospheric nitrogen, respectively.

2.3.2. Sterols

Considering the integrative and conservative feature of sediment matrix over time, sterol analysis was performed in samples collected in winter and autumn. Winter shows the highest rainfall and lowest temperature values, thus integrating the responses of a rainy season. In turn, autumn shows the lowest rainfall, thus integrating the responses of a dry season. Also, this season corresponds to the end of a period of intense touristic activities in the Porto Seguro area.

Aliquots of sediment samples were dried (45 °C), ground to a fine powder with a mortar and pestle, and weighed. Each sediment sample and blank (1 g) were spiked with surrogate, 5 α -androstan-3 β -ol, and then Soxhlet extracted for 12 h with 200 mL of hexane/dichloromethane (1:1) mixture, following the USEPA 3540 method. Extracts were concentrated down to 1 mL, using rotary evaporation and under gentle nitrogen stream. Sulfur was removed with activated copper. Clean-up and fractionation were performed by passing the extract through a silica/alumina column. Silica and alumina were activated at 160 °C for 4 h, and then partially deactivated with 5% Milli-Q water, following the modified USEPA 3640 method. Fractions containing steroids were evaporated to dryness and derivatized using 60 μL of a *N,O* bis

(trimethylsilyl) (BSTFA) trifluoroacetamide and trimethylchlorosilane (TMCS) mixture (9:1) for 90 min at 65 °C. Sterane 5-cholestane was added at the end of the derivatization process, as an internal standard.

Steroid analysis was performed using a Shimadzu GC with Flame Ionization Detector (model GC-17A FID). Compounds were identified based on the retention times of 6 sterols (coprostanol, epicoprostanol, cholesterol, cholestanol, stigmaterol and β -sitosterol) and 1 ketone (cholestanone). Calibration of the peak area to concentration was done within the range of 0.10 to 8.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$, using the steroid standard in the derivatized form. The linear response was >0.995 for all compounds. The limit of detection (LDm, lowest concentration that can be detected and differentiated from the blank with a confidence level of 99%) of the method employed corresponded to 0.03 $\mu\text{g g}^{-1}$ for all compounds.

Ratios between some sterols are considered good indicators of organic matter source and contamination level (Castellanos-Iglesias et al., 2018). The diagnostic indices chosen to improve our evaluation were: I. Coprostanol / (Coprostanol + Cholestanol); II. Fecal sterols / Total sterols * (100); III. Cholestanol / (Cholesterol). Ratio I < 0.3 is indicative of a pristine environment, while Ratio I > 0.5 indicates sewage contamination (Grimalt et al., 1990; Leeming et al., 1998). Ratio II $> 50\%$ indicates high sewage contamination (Hatcher and McGillivray, 1979). Ratio III < 0.5 is indicative of fresh input of organic matter, while Ratio III > 0.5 indicates *in situ* reduction of cholesterol (Canuel and Martens, 1993; Chalaux et al., 1995).

2.3.3. Metals

Seawater samples were analyzed for dissolved metal (Cu, Zn, Cd, and Pb) concentrations. Samples were desalted according to Nadella et al. (2009), and metal concentrations were determined using a High-Resolution Continuum Source Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry (HR-CS GF AAS, Analytic Jena, Germany).

Laboratory quality control (QC) for metal analysis included analysis of seawater reference material for trace metals NASS-6 (National Research Council of Canada NRC - CNRC). Blanks and spiked water samples

were prepared and analyzed at intervals throughout the analytical procedure. Measurements were performed in triplicate. Analytical results of the quality control samples showed good agreement with the certified values, with recoveries ranging from 91.3 to 97.5% for the metals analyzed in seawater.

2.3.4. Density, bleaching frequency and chlorophyll α in *A. gibbosa*

Bleaching frequency and *A. gibbosa* density were assessed following the methods described by Hallock et al. (2003) and Prazeres et al. (2017a). Briefly, the number of individuals showing bleaching (mostly partial bleaching, ~60% of the test) was counted and divided by the total number of individuals analyzed. Dead specimens were differentiated from totally bleached individuals by complete bleaching with absence of protoplasm and lack of reticulopodial activity.

Rubble volume was estimated by volumetric assay. Therefore *A. gibbosa* density was calculated considering the total number of individuals counted in 1 cm³ of substrate (Prazeres et al., 2017a).

Chlorophyll α (Chl α) concentration in *A. gibbosa* individuals was determined using the method described by Schmidt et al. (2011). Briefly, the pigment was extracted with ethanol 95% from each individual, and its concentration was measured using a microplate reader (ELX-800, BioTek, Winooski, VT, USA). For each of the replicates ($n = 3$), Chl α content was measured in a pool of 2 individuals, and was normalized by wet weight.

2.4. Data analysis

The association between environmental quality parameters (sediment, seawater and ecological) and the distance between reef and the Buranhém River mouth were analyzed by exploratory linear correlations (Pearson correlation) (Borcard et al., 2011).

The relationship between abiotic environmental quality markers and the ecological markers, as well as the identification of the potential drivers of the biological detrimental effects observed were analyzed by Redundancy Analysis (RDA). To minimize the number of explanatory variables and avoid multicollinearity, correlations and variance inflation factors were evaluated. Variables showing variance inflation factors above 10 were excluded. The statistical significance of the model was evaluated using Monte Carlo permutation tests (Borcard et al., 2011; Brauko et al., 2016). Statistical analyses were performed using R programming language (R Core Team, 2017).

3. Results

Rainfall and temperature means are described at Table S1. Winter collection had the lowest temperature and higher rainfall. Autumn collection was at the driest.

The environmental quality parameters evaluated were significantly correlated with the distance from the Buranhém River mouth (Tables 1a, 1b, 1c).

Table 1a

Exploratory Pearson correlation matrix of geochemical markers and distance from the Buranhém River mouth. Significant ($p < 0.05$) correlations are in bold. Abbreviations: cop: coprostanol; epicop: epicoprostanol; sole.rol: cholesterol; cole.nol: cholestanol; estigm: stigmaterol; b.sito: β -sitosterol; total.ols: total sterols sum; fecal.ols: cop and epicop sum.

	Distance	DeltaC	DeltaN	cop	epicop	cole.rol	cole.nol	estigm	b.sito	total.ols	fecal.ols
Distance	1	0.42	-0.68	-0.90	-0.73	-0.58	-0.77	-0.52	-0.72	-0.83	-0.86
DeltaC	0.42	1	-0.69	-0.34	-0.19	-0.01	-0.33	0.10	-0.12	-0.19	-0.29
DeltaN	-0.68	-0.69	1	0.55	0.46	0.13	0.68	0.14	0.41	0.48	0.54
cop	-0.90	-0.34	0.55	1	0.84	0.72	0.79	0.50	0.69	0.90	0.97
epicop	-0.73	-0.19	0.46	0.84	1	0.62	0.84	0.56	0.65	0.88	0.94
Cole.rol	-0.58	-0.01	0.13	0.72	0.62	1	0.55	0.67	0.74	0.85	0.70
Cole.nol	-0.77	-0.33	0.68	0.79	0.84	0.55	1	0.41	0.61	0.84	0.84
estigm	-0.52	0.10	0.14	0.50	0.56	0.67	0.41	1	0.91	0.76	0.54
b.sito	-0.72	-0.12	0.41	0.69	0.65	0.74	0.61	0.91	1	0.88	0.70
total.ols	-0.83	-0.19	0.48	0.90	0.88	0.85	0.84	0.76	0.88	1	0.93
fecal.ols	-0.86	-0.29	0.54	0.97	0.94	0.70	0.84	0.54	0.70	0.93	1

3.1. Geochemical markers

3.1.1. Carbon and nitrogen stable isotopes

Stable isotopes biplots (Fig. 2) showed that the sampling site 5 has an isotopic signature significantly different from all other sites, for all seasons.

A trend of seaward increase of $\delta^{13}\text{C}$ values was observed, as well as higher $\delta^{15}\text{N}$ in reefs closer to the river mouth.

3.1.2. Sterols

Stigmaterol and β -sitosterol were detected in samples from all sites, with the highest values (0.58 and 0.51 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively) observed at reef 1 in the rainy season. Also, the maximum value of total sterols (2.78 $\mu\text{g g}^{-1}$) was observed at the reef site 1 in the rainy season (Table 2). Coprostanol and epicoprostanol, indicators of domestic sewage input, were only observed in sampling sites 1, 2 and 3. These sampling sites are located outside the PNMRF and are the closer ones to the river mouth. The highest values were found at reef 1 in the dry season (0.43 and 0.29 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectively), with decreasing values from sampling site 1 to 3 (Table 2).

Diagnostic indices showed an influence of sewage input (ratio I > 0.5) only at the sampling site 1, and no severe contamination (ratio II < 50%). Ratio III values showed input of fresh organic matter only at the sampling site 5 (Table 2).

3.2. Water quality analysis

3.2.1. Dissolved metals

Overall, results showed a trend of reduced metal concentrations at greater distances from the Buranhém River mouth. The highest values of metal concentrations were observed in winter at the reef site 1 (Fig. 3).

3.3. Ecological indicators

Amphistegina gibbosa density, bleaching frequency, and chlorophyll α content at each sampling site and season are shown in Fig. 4. The sampling site 5 was excluded, as no *A. gibbosa* was found.

For RDA, we selected only some abiotic parameters (selected parameters are illustrated in the RDA triplot; Fig. 5). This selection was based on the variance inflation factors and correlation results. The effect of abiotic environmental quality markers on the ecological indicators was statistically significant ($F = 9.05$; $p = 0.001$), and explained 58% of the model variability (adjusted R^2).

3.3.1. *Amphistegina gibbosa* density

Highest population density was observed at the sampling site 4 (Fig. 4a), located inside the PNMRF. The lowest population density was observed at the sampling site 2, for all seasons. Overall, lower densities were observed in the summer. Results from RDA (Fig. 5) indicated

Table 1b

Exploratory Pearson correlation matrix of water quality markers and distance from the Buranhém River mouth. Significant ($p < 0.05$) correlations are in bold.

	Distance	Cu	Zn	Cd	Pb
Distance	1	−0.47	−0.28	−0.35	−0.51
Cu	−0.47	1	0.53	0.77	0.43
Zn	−0.28	0.53	1	0.41	0.22
Cd	−0.35	0.77	0.41	1	0.52
Pb	−0.51	0.43	0.22	0.52	1

that fecal sterols concentration and other variables related to domestic sewage were inversely related to *A. gibbosa* density values.

3.3.2. Bleaching frequency in *Amphistegina gibbosa*

In all seasons, the highest bleaching frequency was observed in foraminifera from reef 1 (Fig. 4b). Results from RDA suggested that Cu concentration was the main factor associated with foraminiferal bleaching responses (Fig. 5).

3.3.3. Chlorophyll α content in *Amphistegina gibbosa*

In a broad view, the higher values of chlorophyll α content were observed in foraminifera from the PNMRF (Fig. 4c). Individuals collected in summer showed the lowest value of chlorophyll α content. When live individuals were found, foraminifera collected at the reef site 1 usually had lower values of chlorophyll α content. RDA and exploratory correlations showed a strong relationship between chlorophyll α content and *A. gibbosa* population density, which was inversely related to sewage indicator parameters (Fig. 5).

4. Discussion

Our hypothesis that environmental quality parameters would correlate with distance from the coast was supported by results obtained. Foraminifera collected in reefs located near the Buranhém River mouth were exposed to higher concentrations of metals and fecal sterols, presented higher bleaching frequency, lower chlorophyll α content and lower population density.

To our best knowledge, no work to date has evaluated South Atlantic coral reef systems' environmental quality using a multi-marker approach. The integrated evaluation of stable isotopes, sterols, metals and ecological effects provided a consistent diagnostic indicating the terrestrial and anthropogenic influence in the reefs closer to the coast.

Distance from the river influenced all the markers assessed, with the strongest effects on nitrogen, fecal sterols, Cu, Pb and foraminifera bleaching. However, it is important to highlight that many factors associated with the distance from the river (including variables not assessed in the present work) may be involved in the observed responses.

4.1. Geochemical markers

Bulk sediment samples from sites 1, 2, 3, and 4 showed $\delta^{13}\text{C}$ values characteristic of marine organic matter, which are typically between -18 and -22‰ (Briand et al., 2015). Additionally, it was possible to differentiate the sampling sites by a relative seaward enrichment in $\delta^{13}\text{C}$ values, which was significantly higher at the sampling site 5. This offshore enrichment pattern was also reported by Claudino et al. (2015),

with extremely high values of carbon stable isotope at reef beaches in an estuary-ocean gradient in northeastern Brazil. Autochthonous organic matter is usually associated with high $\delta^{13}\text{C}$ values (Carreira et al., 2015b; Meyers, 1997). Also, phytoplankton and macroalgae productivity preferentially removes ^{12}C , leaving the residual dissolved inorganic carbon (DIC) pool enriched with ^{13}C (Heikoop et al., 2000). Higher $\delta^{13}\text{C}$ values were observed in sedimentary organic matter collected in offshore reef flats with high biomass coverage of seagrasses in Japan (Umezawa et al., 2008), as well as in reef patches near macroalgae beds in Abrolhos (De Souza et al., 2013). Considering that sampling sites inside the PNMRF (sites 4 and 5) show higher biodiversity than those closer to the river mouth (sampling sites 1 to 3), data on $\delta^{13}\text{C}$ highlighted the autochthonous origin of organic matter inside the PNMRF. We must consider, however, the possibility of inorganic carbon influence on reef 5, irrespective of the acidification treatment.

The use of $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ratio as a biomarker of anthropogenic nutrient loading is suggested for coral reef monitoring (Heikoop et al., 2000; Moss et al., 2005). However, further studies are mandatory to define $\delta^{15}\text{N}$ threshold values (Moss et al., 2005). In the present study, there was a small enrichment with $\delta^{15}\text{N}$, indicating a higher N loading in the reefs closer to shore. Nutrients derived from sewage are generally enriched with $\delta^{15}\text{N}$, especially when they are derived from the anthropogenic dissolved inorganic nitrogen (DIN) present in groundwater (Heikoop et al., 2000). Costa Jr et al. (2006); Costa Júnior et al. (2008) discussed the occurrence and the detrimental effects of submarine groundwater discharge of wastewater on Porto Seguro reefs. Leite et al. (2018) effectively showed a gradient of elemental nitrogen and fecal coliforms, followed by clear responses in coral's microbiome, in the same reefs sampled for the present work. Therefore, we can consider that the enrichment with ^{15}N observed in the sampling sites located near the Buranhém River mouth is a reliable indicator of nutrient enrichment and sewage input.

Coprostanol is the most abundant sterol in human feces, and therefore can be used as a robust sewage tracer (Abreu-Mota et al., 2014; Carreira et al., 2015a; Martins et al., 2008, 2012, and references therein). Additionally, it is also an indicator of livestock sources of organic matter (Hatcher and McGillivray, 1979). Writer et al. (1995) classified sites with coprostanol concentration above $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$ as being contaminated, while Readman et al. (2005) considered $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$ as being an indicative of sewage contamination in sediments. The highest concentration of coprostanol observed in the sampled reefs was $0.41 \mu\text{g g}^{-1}$. This concentration indicates contamination, but not heavily as in many estuaries (Cabral et al., 2018; Carreira et al., 2015a) and densely populated marine sites (Castellanos-Iglesias et al., 2018; Emrich et al., 2017). The coprostanol level was higher in the sampling sites near shore, and was not detected in the sampling sites located inside the PNMRF, indicating no detectable fecal contamination within the marine park area.

Although the thresholds for the abovementioned sterols are still a subject of discussion in literature (Martins et al., 2008, 2014), ratios between some sterols are widely used as diagnostic indices. The combined evaluation of coprostanol levels, ratios I and II, and $\delta^{15}\text{N}$ data indicated that sampling sites 1 and 2 are indeed exposed to sewage, while sampling sites located inside the PNMRF can be considered as being relatively pristine (Abreu-Mota et al., 2014; Briand et al., 2015; Grimalt et al., 1990; Hatcher and McGillivray, 1979; Leeming et al., 1998; Martins et al., 2014). Ratio III values corroborated with $\delta^{13}\text{C}$ data and are evidences of the presence of autochthonous organic matter in sampling site 5, indicating an input of fresh organic matter (Briand et al., 2015; Canuel and Martens, 1993; Chalaux et al., 1995; De Souza et al., 2013).

Most studies evaluating fecal sterols in Brazil have been carried out in southeastern, subtropical, estuarine systems (Carreira et al., 2015b; Martins et al., 2011, 2012, 2014). Carreira et al. (2016) analyzed sterols in the Camamu Bay (Bahia state, northeastern Brazil), a tropical estuary located approximately 280 km north of Porto Seguro, reporting very low

Table 1c

Exploratory Pearson correlation matrix of ecological markers and distance from the Buranhém River mouth. Significant ($p < 0.05$) correlations are in bold. Marginally significant correlations are in italic.

	Distance	Density	Bleaching	Chl α
Distance	1	0.51	−0.69	<i>0.24</i>
Density	0.51	1	<i>−0.09</i>	0.63
Bleaching	−0.69	<i>−0.09</i>	1	0.19
Chl α	0.243	0.63	0.19	1

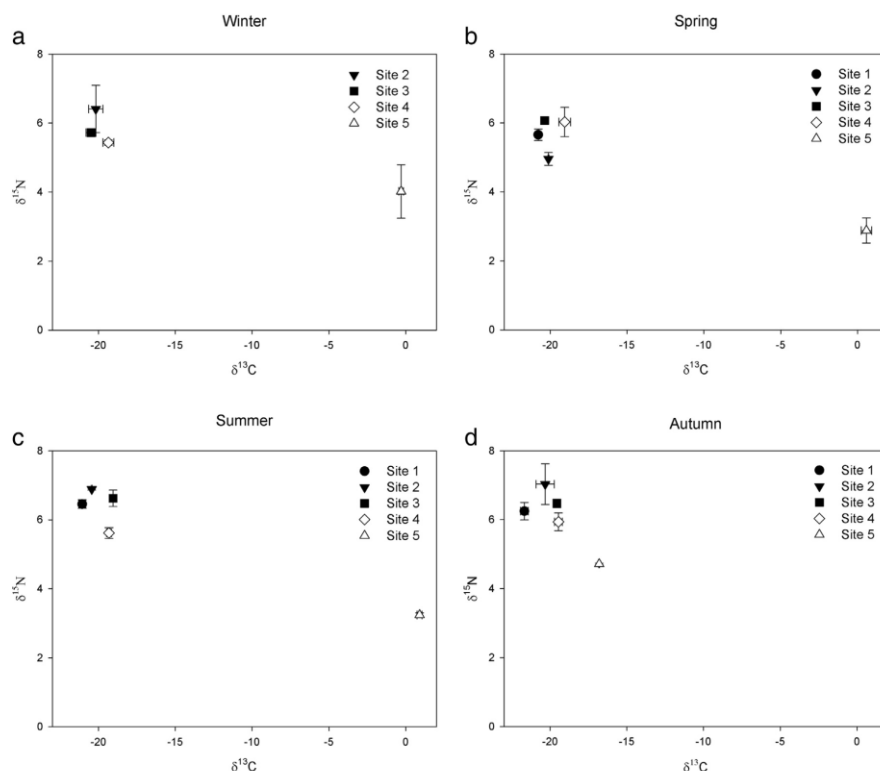


Fig. 2. Carbon and nitrogen stable isotopes biplots for each sampling site, at each season.

concentrations of coprostanol. Our study is the first one to report sterol analysis in South Atlantic coral reef systems.

Emrich et al. (2017) found moderate to severe sewage contamination in inshore coral reefs from Belize, with coprostanol levels above $0.1 \mu\text{g g}^{-1}$, and sometimes even higher than $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$. Fecal sterols and diagnostic ratios in these Belize reefs were negatively correlated with foraminiferal diversity and densities of symbiont-bearing species, which corroborates with our findings regarding population density of *A. gibbosa*. In Cuban reefs, Castellanos-Iglesias et al. (2018) found

coprostanol levels higher than $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$, associated with altered hydroid assemblages.

Sitosterol and stigmasterol are commonly related to higher terrestrial plants, tracing terrestrial influence in sedimentary organic matter (Derrien et al., 2017; Volkman, 1986). β -sitosterol, the 24β isomer of sitosterol, is better correlated with terrestrial/riverine influence (Canuel and Zimmerman, 1999; Carreira et al., 2015b, 2016; Martins et al., 2007; Saavedra et al., 2014; Volkman, 1986). Indeed, its concentration showed a strong relationship with the distance from the coast, as well

Table 2

Mean values of sterols ($\mu\text{g g}^{-1}$) and diagnostic indices at each season and sampling site.

Sampling site	Rainy season					Dry season				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Coprostanol	0.267	0.263	0.173	0.000	0.000	0.410	0.307	0.170	0.000	0.000
Epicoprostanol	0.130	0.197	0.000	0.000	0.000	0.170	0.247	0.067	0.000	0.000
Cholesterol	0.667	0.455	0.468	0.213	0.357	0.463	0.537	0.260	0.117	0.337
Cholestanol	0.440	0.567	0.397	0.220	0.107	0.377	0.693	0.377	0.267	0.090
Stigmasterol	0.553	0.288	0.142	0.168	0.260	0.297	0.387	0.260	0.217	0.260
β -Sitosterol	0.460	0.240	0.162	0.152	0.155	0.263	0.350	0.213	0.167	0.143
Cholestanone	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm	<LDm
Fecal sterols	0.397	0.460	0.173	<LDm	<LDm	0.580	0.553	0.237	<LDm	<LDm
Total sterols	2.520	2.007	1.340	0.757	0.877	1.957	2.517	1.340	0.763	0.840
ratio I	0.377	0.317	0.304	nc	nc	0.521	0.307	0.311	nc	nc
ratio II	15.741	22.924	12.935	nc	nc	29.642	21.987	17.662	nc	nc
ratio III	0.660	1.245	0.847	1.031	0.299	0.813	1.292	1.449	2.286	0.267

nc; not calculated;; <LDm; value detected, but smaller than the detection limit of the method; LDm = $0.03 \mu\text{g g}^{-1}$.

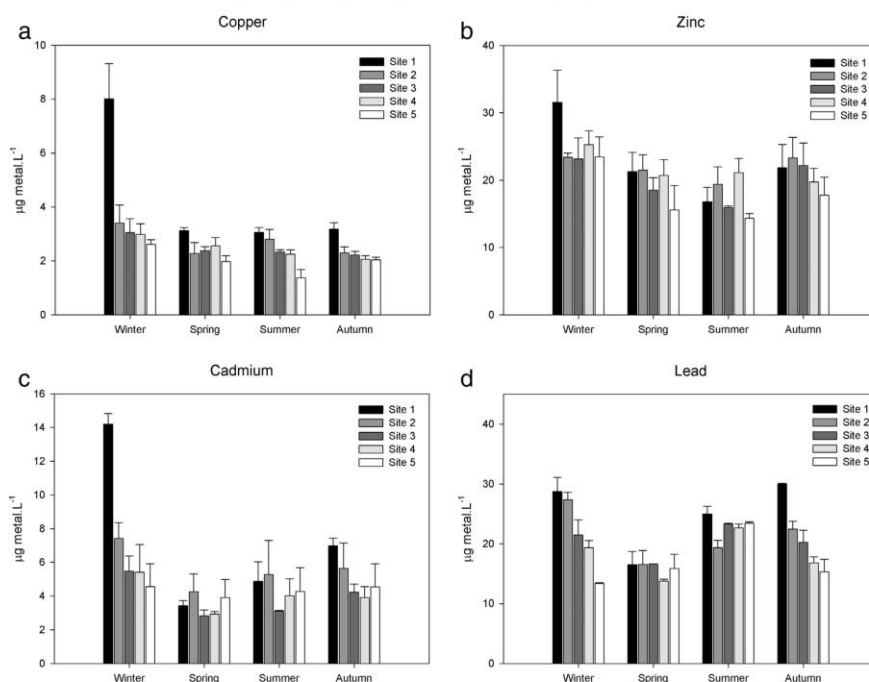


Fig. 3. Mean ($\pm\text{SE}$) values of metals concentrations at each reef site and season.

as other markers of terrestrial/riverine input analyzed in the present study. In turn, stigmasterol can also be produced by marine macroalgae and seagrasses (Derrien et al., 2017). This fact would explain the slight increase in its levels at the sampling site 5. It is important to consider that sampling site 5 may also receive some influence of other rivers, which are located north of the Buranhém River.

4.2. Water quality parameters

Peak concentrations of metals, were considerably related to the distance from the coast. This is an expected result, considering that rivers are one of the main drivers of metal contamination to coastal areas (Lopes-Rocha et al., 2017; Martins et al., 2012; Rocha et al., 2017; van Dam et al., 2011). Also, it corroborates with findings reported by other studies on gradients of river discharge distance (Lopes-Rocha et al., 2017; Monroy et al., 2014).

Regarding water quality guidelines, Cu and Cd concentrations in seawater collected at the sampling site 1 during winter were higher than the water quality criteria established by the current Brazilian (CONAMA, 2005) and USA (USEPA) environmental guidelines. This reinforces the hypothesis that the influence of the Buranhém River reduces water quality in coastal reefs of Porto Seguro in northeastern Brazil. Pb concentrations in seawater collected at all sampling sites and seasons were above the current water quality criteria established by the current Brazilian (CONAMA, 2005) and USA (USEPA) environmental guidelines. Considering the Great Barrier Reef Heritage Water Quality Guidelines, based on Australian Water Quality Guidelines for Fresh and Marine Waters (2010), all sampled reefs would be considered contaminated with at least one of the analyzed metals, in all seasons.

Metals can be toxic to key reef species, causing direct effects at cellular, organism, population, and community levels (Browne et al., 2015;

Marangoni et al., 2017; Negri and Hoogenboom, 2011; Prazeres et al., 2011; Restrepo et al., 2016). Regarding symbiont-bearing foraminifera responses, Prazeres et al. (2012a, 2012b) reported enhanced bleaching frequency and biochemical responses indicative of oxidative stress in *Amphistegina* spp. from contaminated reefs showing Cu concentrations similar to the observed in the present study ($10.3 \mu\text{g L}^{-1}$). Prazeres et al. (2011) reported oxidative stress and bleaching in *A. lessonii* acutely exposed to Zn concentrations similar to the maximum concentration observed for this metal in the present study ($41.1 \mu\text{g L}^{-1}$). Cu concentrations lower than the water quality criteria established by the current Brazilian environmental guidelines (CONAMA, 2005) were shown to cause detrimental physiological effects in *A. gibbosa* only when combined to ocean acidification (Marques et al., 2017). It is therefore imperative to consider that the pressure imposed by multiple stressors can cause harmful effects in organisms exposed even to low metal concentrations. Considering that reefs located near the Buranhém River mouth are exposed to frequent and wide changes in environmental parameters, river water containing multiple contaminants, sediment and nutrient enrichment, they can be considered as being more vulnerable to metals exposure, even at concentrations lower than the current water quality criteria guidelines.

4.3. Ecological indicators

Population density of *A. gibbosa* was significantly reduced in summer. Several authors reported reduced symbiont-bearing species density during increased temperature periods, especially when associated with high UV radiance (Barbosa et al., 2016; Fujita et al., 2016; Kelmo and Hallock, 2013). Periods of elevated temperature and low rainfall, as the summer period in the present study, are expected to impose a severe thermal and photic stress to photosymbionts. Additionally,

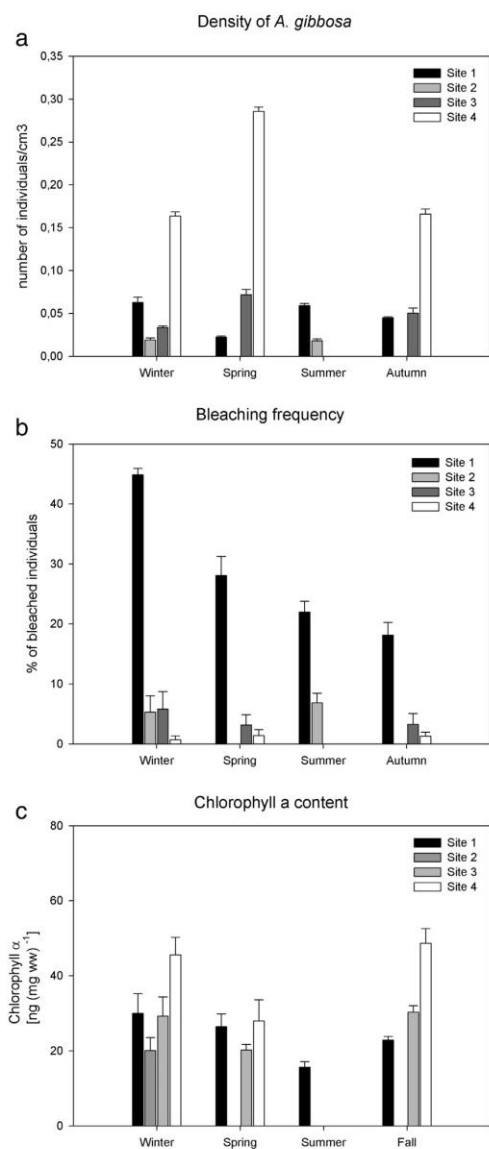


Fig. 4. Values (mean $\pm$ SE) of *Amphistegina gibbosa* (a) density, (b) bleaching frequency and (c) chlorophyll α content at each reef site and season.

Amphistegina populations from shallow reefs can be dramatically reduced during heat waves once they are exposed to an even higher degree of photic stress (Baker et al., 2009). Sampling sites inside the PNMRF (reefs 4 and 5) are shallower than reefs 1–3, explaining the expressively lower numbers of *A. gibbosa* found in the offshore reefs during summer.

The ecological parameters analyzed were significantly correlated to the distance from the river. RDA showed some relationship between *Amphistegina* densities and sewage descriptors, similarly to Emrich

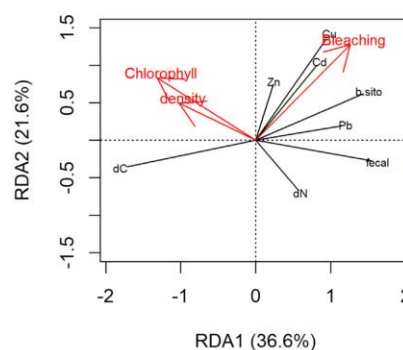


Fig. 5. RDA triplot for the relationship among selected geochemical/water quality indicators (black arrows) and ecological indicators (red arrows). Arrows indicate the parameter increase direction, and angles reflect their correlations. dC: $\delta^{13}\text{C}$; dN: $\delta^{15}\text{N}$; fecal: the sum of fecal sterols concentrations; b.sito: β -sitosterol concentration. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

et al. (2017) findings. The physiological mechanisms involved in the responses to sewage presence are poorly understood, so it is challenging to discuss the potential association between populational responses and sewage. However, they are likely related to nitrification and food availability affecting symbiosis.

A strong correlation between foraminiferal bleaching frequency and density was expected (Prazeres et al., 2012b), but this was not observed in the present study. Prazeres et al. (2016, 2017b) discussed how populations collected from different sites deal with temperature and nutrient stress differently, suggesting some kind of phenotypic plasticity among populations from different reefs. This may explain why higher bleaching frequencies were not strictly followed by reduced foraminifera population density. In this case, foraminifera populations from reef site 1 could be more adapted/acclimated to environmental changes.

The marked effect of dissolved Cu exposure on bleaching observed in the present study was also reported by Prazeres et al. (2012a, 2012b) in foraminifera from Fernando de Noronha reefs (Pernambuco state, northeastern Brazil). Cu can also cause oxidative stress in corals (Fonseca et al., 2017; Marangoni et al., 2017), which is one of the main causes of bleaching in these organisms (Downs et al., 2002).

Chlorophyll α content was higher in foraminifera from reef 4, which is located inside the PNMRF and shows the lowest level of anthropogenic influence. Chlorophyll level was strongly correlated with population density, but did not respond clearly to visual bleaching. The higher levels of chlorophyll α observed in foraminifera from reef 4, which had the lowest bleaching frequency, indicated a healthy population. In the present study, metal, sewage contamination and detrimental ecological effects were related to the distance from the river mouth. These effects were enhanced in the rainy season, suggesting land-based source pollution (Fabricius, 2005; Fabricius et al., 2013; Rocker et al., 2017). Therefore, adequate management of watersheds and land use is crucial for coral reef conservation (Brodie et al., 2017; Takesue and Storlazzi, 2017), especially when combined with coral reef monitoring. Our results show that an integrated and multi-marker approach can provide consistent diagnostics indicating anthropogenic influence in coral reefs. Also, they highlight that monitoring of symbiont-bearing foraminiferal populations is effective to detect environmental health degradation in this ecosystem.

5. Conclusions

Coral reef patches located near the Buranhém River mouth presented declined environmental health, evidenced by reduced water

and sediment quality, as well as detrimental ecological effects in populations of the larger benthic foraminifera *A. gibbosa*. Reef sites located inside the PNMRF area can be considered as being nearly pristine, according to the water quality data (low concentrations of metals) and geochemical indicators responses. Populations of *A. gibbosa* in this area were healthier (lowest bleaching frequency) than those collected at the other reefs. On the other hand, sites located closer to the coast showed considerable concentrations of Cu, Pb, and sewage contamination, higher terrigenous influence, and foraminifera with the highest bleaching frequency. In summary, findings reported in the present study indicate that coastal Brazilian reefs are subjected to multiple anthropogenic stressors. Additionally, they point out that the water quality, geochemical and ecological indicators employed in the present study were effective as biomonitoring tools that can be used in reef areas worldwide.

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.154>.

Acknowledgments

Support for field research is acknowledged to the “Projeto Coral Vivo”, which is sponsored by the Petrobras Socio-environmental Program of Petróleo Brasileiro S.A. (Petrobras, Brazil) and the Arraial d'Ajuda Eco Parque (Brazil). Financial support is acknowledged to the International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - Programa Ciências do Mar II, Brasília, DF, Brazil). We thank Maria Gabriela Fernandes Dias for graphical abstract production. We thank Dr. Deborah Leite and Dr. Raquel Peixoto for sharing subsamples from the project. A. Bianchini is a research fellow from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; Brasília, DF, Brazil; Proc. # Proc. # 307647/2016-1) and supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC, Canada. J.A. Marques is a graduate fellow from CAPES.

References

- Abreu-Mota, M., Barboza, C.A. de M., Bicego, M.C., Martins, C.C., 2014. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: a multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. *Chemosphere* 103, 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.11.052>.
- Australian Water Quality Guidelines for Fresh and Marine Waters, 2010. National Water Quality Management Strategy. ANZECC, Canberra.
- Baker, R.D., Hallock, P., Moses, E.F., Williams, D.E., Ramirez, A., 2009. Larger foraminifera of the Florida reef tract, USA: distribution patterns on reef-rubble habitats. *J. Foraminif. Res.* 39, 267–277. <https://doi.org/10.2113/gsfjr.39.4.267>.
- Ban, S.S., Graham, N.A.J., Connolly, S.R., 2014. Evidence for multiple stressor interactions and effects on coral reefs. *Glob. Chang. Biol.* 20, 681–697. <https://doi.org/10.1111/gcb.12453>.
- Barbosa, C.F., Seoane, J.C.S., Dias, B.B., Allevato, B., Brooks, P.O.S., Gaspar, A.L.B., Cordeiro, R.C., 2016. Health environmental assessment of the coral reef-supporting Tamandaré Bay (NE, Brazil). *Mar. Micropaleontol.* 127, 63–73. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2016.07.004>.
- Bartley, R., Bainbridge, Z.T., Lewis, S.E., Kroon, F.J., Wilkinson, S.N., Brodie, J.E., Silburn, D.M., 2014. Relating sediment impacts on coral reefs to watershed sources, processes and management: a review. *Sci. Total Environ.* 468–469, 1138–1153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.09.030>.
- Birkeland, C. (Ed.), 2015. *Coral Reefs in the Anthropocene*. Springer, Berlin Heidelberg, Netherlands.
- Bomfim, A.R., 2012. Caracterização das ações antrópicas na microbacia hidrográfica do Rio dos Mangues. Porto Seguro - Bahia, Brasil.
- Borcard, D., Gillet, F., Legendre, P., 2011. *Numerical Ecology with R*. Springer, Baltimore.
- Brauko, K.M., Muniz, P., Martins, C.D.C., Lana, P. da C., 2016. Assessing the suitability of five benthic indices for environmental health assessment in a large subtropical South American estuary. *Ecol. Indic.* 64, 258–265. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2016.01.008>.
- Briand, M.J., Bonnet, X., Goiran, C., Guillou, G., Letourneur, Y., 2015. Major sources of organic matter in a complex coral reef lagoon: identification from isotopic signatures ($\delta^{13}\text{C}$ and $\delta^{15}\text{N}$). *PLoS One* 10, 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131555>.
- Brodie, J.E., Lewis, S.E., Collier, C.J., Wooldridge, S., Bainbridge, Z.T., Waterhouse, J., Rasheed, M.A., Honchin, C., Holmes, G., Fabricius, K., 2017. Setting ecologically relevant targets for river pollutant loads to meet marine water quality requirements for the Great Barrier Reef, Australia: a preliminary methodology and analysis. *Ocean Coast. Manag.* 143, 136–147. <https://doi.org/10.1016/j.ocecoaman.2016.09.028>.
- Browne, N.K., Tay, J.K.L., Low, J., Larson, O., Todd, P.A., 2015. Fluctuations in coral health of four common inshore reef corals in response to seasonal and anthropogenic changes in water quality. *Mar. Environ. Res.* 105, 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2015.02.002>.
- Cabral, A.C., Stark, J.S., Kolm, H.E., Martins, C.C., 2018. An integrated evaluation of some faecal indicator bacteria (FIB) and chemical markers as potential tools for monitoring sewage contamination in subtropical estuaries. *Environ. Pollut.* 235, 739–749. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.12.109>.
- Canuel, E.A., Martens, C.S., 1993. Seasonal variations in the sources and alteration of organic matter associated with recently-deposited sediments. *Org. Geochem.* 20, 563–577. [https://doi.org/10.1016/0146-6380\(93\)90024-6](https://doi.org/10.1016/0146-6380(93)90024-6).
- Canuel, E.A., Zimmerman, A.R., 1999. Composition of particulate organic matter in the southern Chesapeake Bay: sources and reactivity. *Estuaries* 980–994.
- Carreira, R.S., Albergaria-Barbosa, A.C.R., Arguelho, M.L.P.M., Garcia, C.A.B., 2015a. Evidence of sewage input to inner shelf sediments in the NE coast of Brazil obtained by molecular markers distribution. *Mar. Pollut. Bull.* 90, 312–316. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2014.11.011>.
- Carreira, R.S., Cordeiro, L.G.M.S., Oliveira, D.R.P., Baêta, A., Wagener, A.L.R., 2015b. Source and distribution of organic matter in sediments in the SE Brazilian continental shelf influenced by river discharges: an approach using stable isotopes and molecular markers. *J. Mar. Syst.* 141, 80–89. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2014.05.017>.
- Carreira, R.S., Cordeiro, L.G.M.S., Bernardes, M.C., Hatje, V., 2016. Distribution and characterization of organic matter using lipid biomarkers: a case study in a pristine tropical bay in NE Brazil. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 168, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.11.007>.
- Castellanos-Iglesias, S., Cabral, A.C., Martins, C.C., Di Domenico, M., Rocha, R.M., Haddad, M.A., 2018. Organic contamination as a driver of structural changes of hydroid's assemblages of the coral reefs near to Havana Harbour, Cuba. *Mar. Pollut. Bull.* 133, 568–577. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2018.06.003>.
- Castro, C.B., Pires, D.O., 2001. Brazilian Coral Reefs: What We Already Know and What Is Still Missing. 69 pp. 357–371.
- Castro, C.B., Segal, B., Negrão, F., Calderon, E.N., 2012. Four-year monthly sediment deposition on turbid southwestern Atlantic coral reefs, with a comparison of benthic assemblages. *Braz. J. Oceanogr.* 60, 49–63.
- Chaloux, N., Takada, H., Bayona, J.M., 1995. Molecular markers in Tokyo Bay sediments: sources and distribution. *Mar. Environ. Res.* 40, 77–92. [https://doi.org/10.1016/0141-1136\(95\)90001-8](https://doi.org/10.1016/0141-1136(95)90001-8).
- Claudio, M.C., Pessanha, A.L.M., Araújo, F.G., Garcia, A.M., 2015. Trophic connectivity and basal food sources sustaining tropical aquatic consumers along a mangrove to ocean gradient. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 167, 45–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2015.07.005>.
- CONAMA, 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005 Brasília, Brazil.
- Cooper, T.F., Gilmour, J.P., Fabricius, K.E., 2009. Bioindicators of changes in water quality on coral reefs: review and recommendations for monitoring programmes. *Coral Reefs* 28, 589–606. <https://doi.org/10.1007/s00338-009-0512-x>.
- Cordeiro, L.G.M.S., Wagener, A.L.R., Carreira, R.S., 2018. Organic matter in sediments of a tropical and upwelling influenced region of the Brazilian continental margin (Campos Basin, Rio de Janeiro). *Org. Geochem.* 120, 86–98. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2018.01.005>.
- Costa Jr., O.S., Attrill, M.J., Nimmo, M., 2006. Seasonal and spatial controls on the delivery of excess nutrients to nearshore and offshore coral reefs of Brazil. *J. Mar. Syst.* 60, 63–74. <https://doi.org/10.1016/j.jmarsys.2005.11.006>.
- Costa Júnior, O.S., Nimmo, M., Attrill, M.J., 2008. Coastal eutrophication in Brazil: a review of the role of nutrient excess on coral reef demise. *J. S. Am. Earth Sci.* 25, 257–270. <https://doi.org/10.1016/j.jsames.2007.10.002>.
- van Dam, J.W., Negri, A.P., Uthicker, S., Mueller, J.F., 2011. Chemical pollution on coral reefs: exposure and ecological effects. In: Sanchez-Bayo, F., van den Brink, P.J., Mann, R.M. (Eds.), *Ecological Impacts of Toxic Chemicals*. Bentham Science Publishers, Amsterdam, Netherlands, pp. 187–211.
- De Souza, J.R.B., Costa, A.B., De Azevedo, A.E.G., Santos, T.H.R. Dos, Spano, S., Lentini, C.A.D., Bonabamba, T.J., Silva, R.D.O., Novotny, E.H., Zucchi, M.D.R., 2013. Carbon and nitrogen stable isotope compositions of organic matter in marine sediment cores from the Abrolhos region: indicators of sources and preservation. *Geochim. Bras.* 27, 13–23. <https://doi.org/10.5327/Z0102-9800201300010002>.
- Derrien, M., Yang, L., Hur, J., 2017. Lipid biomarkers and spectroscopic indices for identifying organic matter sources in aquatic environments: a review. *Water Res.* 112, 58–71. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.01.023>.
- Dessandier, P.A., Bonnin, J., Kim, J.H., Bichon, S., Gremare, A., Deflandre, B., de Stigter, H., Malaize, B., 2015. Lateral and vertical distributions of living benthic foraminifera off the Douro River (western Iberian margin): impact of the organic matter quality. *Mar. Micropaleontol.* 120, 31–45. <https://doi.org/10.1016/j.marmicro.2015.09.002>.
- Downs, C. a, Fauth, J.E., Halas, J.C., Dustan, P., Bemiss, J., Woodley, C.M., 2002. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 533–543. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)00907-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)00907-3).
- Emrich, K., Martinez-Colon, M., Alegria, H., 2017. Is untreated sewage impacting coral reefs of Caye Caulker, Belize? *J. Foraminif. Res.* 47, 20–33. <https://doi.org/10.2113/gsfjr.47.1.20>.
- Fabricius, K.E., 2005. Effects of terrestrial runoff on the ecology of corals and coral reefs: review and synthesis. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 125–146. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.028>.
- Fabricius, K.E., De'ath, G., Humphrey, C., Zagorskis, I., Schaffelke, B., 2013. Intra-annual variation in turbidity in response to terrestrial runoff on near-shore coral reefs of the Great Barrier Reef. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 116, 57–65. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2012.03.010>.
- Fonseca, J. da S., de Barros Marangoni, L.F., Marques, J.A., Bianchini, A., 2017. Effects of increasing temperature alone and combined with copper exposure on biochemical and physiological parameters in the zooxanthellate scleractinian coral *Mussismilia harttii*. *Aquat. Toxicol.* 190, 121–132. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.07.002>.

- Fujita, K., Ootomaru, M., Lopati, P., Hosono, T., Kayanne, H., 2016. Shell productivity of the large benthic foraminifer *Baculogypsina sphaerulata*, based on the population dynamics in a tropical reef environment. *Coral Reefs* 35, 317–326. <https://doi.org/10.1007/s00338-015-1375-y>.
- Grimalt, J.O., Fernandez, P., Bayona, J.M., Albaiges, J., 1990. Assessment of fecal sterols and ketones as indicators of urban sewage inputs to coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 24, 357–363. <https://doi.org/10.1021/es00073a011>.
- Hallock, P., Lidz, B.H., Cockey-Burkhard, E.M., Donnelly, K.B., 2003. Foraminifera as bioindicators in coral reef assessment and monitoring: the FORAM Index. *Environ. Monit. Assess.* 81, 221–238. <https://doi.org/10.1023/A:102337310386>.
- Hatcher, P.G., McGillivray, P.A., 1979. Sewage contamination in the New York Bight. Coprostanol as an indicator. *Environ. Sci. Technol.* 13, 1225–1229. <https://doi.org/10.1021/es60158a015>.
- Heikoop, J.M., Risk, M.J., Lazier, A.V., Edinger, E.N., Jompa, J., Limmon, G.V., Dunn, J.J., Browne, D.R., Schwarcz, H.P., 2000. Nitrogen-15 signals of anthropogenic nutrient loading in reef corals. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 628–636. [https://doi.org/10.1016/S0025-326X\(00\)00060-0](https://doi.org/10.1016/S0025-326X(00)00060-0).
- Hoegh-Guldberg, O., 2014. Coral reef sustainability through adaptation: glimmer of hope or persistent mirage? *Curr. Opin. Environ. Sustain.* 7, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.coesust.2014.01.005>.
- Jona-Lasinio, G., Costantini, M.L., Calizza, E., Pollice, A., Bentivoglio, F., Orlandi, L., Careddu, G., Rossi, L., 2015. Stable isotope-based statistical tools as ecological indicator of pollution sources in Mediterranean transitional water ecosystems. *Ecol. Indic.* 55, 23–31. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.03.006>.
- Kelmo, F., Hallock, P., 2013. Responses of foraminiferal assemblages to ENSO climate patterns on bank reefs of northern Bahia, Brazil: a 17-year record. *Ecol. Indic.* 30, 148–157. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.02.009>.
- Langer, M.R., Hottinger, L., 2000. Biogeography of selected “larger” foraminifera. *Microplaeontology* 46, 105–126.
- Leão, Z.M.A.N., Kikuchi, R.K.P., Testa, V., 2003. Corals and coral reefs of Brazil. In: Cortés, J. (Ed.), *Latin American Coral Reefs*. Elsevier, pp. 9–52. <https://doi.org/10.1016/B978-0-44451388-5/00003-5>.
- Leeming, R., Bate, N., Hewlett, R., Nichols, P.D., 1998. Discriminating faecal pollution: a case study of stormwater entering Port Phillip Bay, Australia. *Water Sci. Technol.* 38, 15–22. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(98\)00728-8](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(98)00728-8).
- Leite, D.C.A., Salles, J.F., Calderon, E.N., Castro, C.B., Bianchini, A., Marques, J.A., van Elsas, J.D., Peixoto, R.S., 2018. Coral bacterial-core abundance and network complexity as proxies for anthropogenic pollution. *Front. Microbiol.* 9, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00833>.
- Lopes-Rocha, M., Langone, L., Miserocchi, S., Giordano, P., Guerra, R., 2017. Spatial patterns and temporal trends of trace metal mass budgets in the western Adriatic sediments (Mediterranean Sea). *Sci. Total Environ.* 599–600. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.04.114>.
- Marangoni, L.F. de B., Marques, J.A., Duarte, G.A.S., Pereira, C.M., Calderon, E.N., Castro, C.B., Bianchini, A., 2017. Copper effects on biomarkers associated with photosynthesis, oxidative status and calcification in the Brazilian coral *Mussismilia hartii* (Scleractinia, Mussidae). *Mar. Environ. Res.* <https://doi.org/10.1016/j.marenvres.2017.08.002>.
- Marques, J.A., de Barros Marangoni, L.F., Bianchini, A., 2017. Combined effects of sea water acidification and copper exposure on the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina gibbosa*. *Coral Reefs* 36, 489–501. <https://doi.org/10.1007/s00338-017-1547-z>.
- Martins, C.D.C., Fillmann, G., Montone, R.C., 2007. Natural and anthropogenic sterols inputs in surface sediments of Patos Lagoon, Brazil. *J. Braz. Chem. Soc.* 18, 106–115. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532007000100012>.
- Martins, C.D.C., Boechat, F., Gomes, A., Aureliano, J., Montone, R.C., 2008. Marcadores orgânicos de contaminação por efluentes sanitários em sedimentos superficiais da Baía de Santos, São Paulo. *Quim. Nova* 31, 1008–1014. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500012>.
- Martins, C.D.C., Seyffert, B.H., Braun, J.A.F., Fillmann, G., 2011. Input of organic matter in a large South American tropical estuary (Paraná estuarine system, Brazil) indicated by sedimentary sterols and multivariate statistical approach. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1585–1594. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532011000800023>.
- Martins, C.C., Bicego, M.C., Figueira, R.C.L., Lourenço, J., Angelli, F., Combi, T., Gallice, W.C., Mansur, A.V., Nardes, E., Rocha, M.L., Wisniewski, E., Ceschim, L.M.M., Ribeiro, A.P., 2012. Multi-molecular markers and metals as tracers of organic matter inputs and contamination status from an environmental protection area in the SW Atlantic (Laranjeiras Bay, Brazil). *Sci. Total Environ.* 417–418, 158–168. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.11.086>.
- Martins, C.C., Cabral, A.C., Barbosa-Cintra, S.C.T., Dauner, A.L.L., Souza, F.M., 2014. An integrated evaluation of molecular marker indices and linear alkylbenzenes (LABs) to measure sewage input in a subtropical estuary (Babitonga Bay, Brazil). *Environ. Pollut.* 188, 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2014.01.022>.
- Meyers, P.A., 1997. Organic geochemical proxies of paleoceanographic, paleolimnologic, and paleoclimatic processes. *Org. Geochem.* 27, 213–250.
- Monroy, M., Maceda-Veiga, A., de Sostoa, A., 2014. Metal concentration in water, sediment and four fish species from Lake Titicaca reveals a large-scale environmental concern. *Sci. Total Environ.* 487, 233–244. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.134>.
- Moss, A., Brodie, J., Furnas, M., 2005. Water quality guidelines for the Great Barrier Reef World Heritage Area: a basis for development and preliminary values. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 76–88. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.10.052>.
- Nadella, S.R., Fitzpatrick, J.L., Franklin, N., Bucking, C., Smith, S., Wood, C.M., 2009. Toxicity of dissolved Cu, Zn, Ni and Cd to developing embryos of the blue mussel (*Mytilus trossulus*) and the protective effect of dissolved organic carbon. *Comp. Biochem. Physiol., Part C: Toxicol. Pharmacol.* 149, 340–348.
- Negri, A.P., Hoogenboom, M.O., 2011. Water contamination reduces the tolerance of coral larvae to thermal stress. *PLoS One* 6, e19703. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019703>.
- Norstrom, A.V., Nystrom, M., Jouffray, J.B., Folke, C., Graham, N.A.J., Moberg, F., Olsson, P., Williams, G.J., 2016. Guiding coral reef futures in the Anthropocene. *Front. Ecol. Environ.* 14, 490–498. <https://doi.org/10.1002/fee.1427>.
- Oberling, D.F., La Rovere, E.L., Silva, Oliveira, De, H.V., 2013. SEA making inroads in land-use planning in Brazil: the case of the extreme south of Bahia with forestry and biofuels. *Land Use Policy* 35, 341–358. <https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2013.06.012>.
- Prazeres, M.D.F., Martins, S.E., Bianchini, A., 2011. Biomarkers response to zinc exposure in the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina lessonii* (Amphisteginidae, foraminifera). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 407, 116–121. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2011.07.015>.
- Prazeres, M.D.F., Martins, S.E., Bianchini, A., 2012a. Impact of metal exposure in the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina lessonii*. 12th International Coral Reef Symposium, pp. 13–16.
- Prazeres, M.D.F., Martins, S.E., Bianchini, A., 2012b. Assessment of water quality in coastal waters of Fernando de Noronha, Brazil: biomarker analyses in *Amphistegina lessonii*. *J. Foraminif. Res.* 42, 56–65.
- Prazeres, M., Uthick, S., Pandolfi, J.M., 2016. Influence of local habitat on the physiological responses of large benthic foraminifera to temperature and nutrient stress. *Sci. Rep.* 6, 21936. <https://doi.org/10.1038/srep21936>.
- Prazeres, M., Roberts, T.E., Pandolfi, J.M., 2017a. Shifts in species abundance of large benthic foraminifera *Amphistegina*: the possible effects of tropical cyclone Ita. *Coral Reefs* 36, 305–309. <https://doi.org/10.1007/s00338-016-1497-x>.
- Prazeres, M., Roberts, T.E., Pandolfi, J.M., 2017b. Variation in sensitivity of large benthic foraminifera to the combined effects of ocean warming and local impacts. *Sci. Rep.* 7 (45227), 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep45227>.
- R Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria <https://www.R-project.org/>.
- Readman, J.W., Fillmann, G., Tolosa, I., Bartocci, J., Mee, L.D., 2005. The use of steroid markers to assess sewage contamination of the Black Sea. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 310–318. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.11.002>.
- Restrepo, J.D., Park, E., Aquino, S., Latrubesse, E.M., 2016. Coral reefs chronically exposed to river sediment plumes in the southwestern Caribbean: Rosario Islands, Colombia. *Sci. Total Environ.* 553, 316–329. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.02.140>.
- Rocha, M.L., Sa, F., Campos, M.S., Grassi, M.T., Combi, T., Machado, E. da C., 2017. Metals impact into the Paranaguá Estuarine Complex (Brazil) during the exceptional flood of 2011. *Braz. J. Oceanogr.* 65, 54–68. <https://doi.org/10.1590/1679-87592017127706501>.
- Rocker, M.M., Francis, D.S., Fabricius, K.E., Willis, B.L., Bay, L.K., 2017. Variation in the health and biochemical condition of the coral *Acropora tenuis* along two water quality gradients on the Great Barrier Reef, Australia. *Mar. Pollut. Bull.* 119, 106–119. <https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2017.03.066>.
- Rodríguez-Ramírez, A., Bastidas, C., Cortés, J., Guzmán, H., Leão, Z., Garzón-Ferreira, J., Kikuchi, R., Pandovani Ferreira, B., Alvarado, J.J., Jiménez, C., Fonseca, A.C., Salas, E., 2008. Status of coral reefs and associated ecosystems in Southern Tropical America: Brazil, Colombia, Costa Rica, Panamá and Venezuela. Status of Coral Reefs of the World, pp. 281–294.
- Ross, B.J., Hallock, P., 2014. Chemical toxicity on coral reefs: bioassay protocols utilizing benthic foraminifera. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 457, 226–235. <https://doi.org/10.1016/j.jembe.2014.04.020>.
- Saavedra, L., Quiñones, R.A., Becerra, J., 2014. Distribution and sources of phytosterols in coastal and river sediments of south-central Chile. *Lat. Am. J. Aquat. Res.* 42, 61–84 (103856/vol42-issue1-fulltext-5).
- Santos, A.S., 2013. Concentração de clorofila-a, fracionada e nutrientes inorgânicos dissolvidos na plataforma continental da Bahia. Universidade Estadual de Santa Cruz.
- Sarmiento-Soares, L.M., Mazzoni, R., Martins-Pinheiro, R.F., 2008. A fauna de peixes dos Rios dos Portos Seguros, extremo sul da Bahia, Brasil. *Bol. Mus. Biol. Mello Leitão* 24, 119–142.
- Schmidt, C., Heinz, P., Kucera, M., Uthick, S., 2011. Temperature-induced stress leads to bleaching in larger benthic foraminifera hosting endosymbiotic diatoms. *Limnol. Oceanogr.* 56, 1587–1602. <https://doi.org/10.4319/lo.2011.56.5.1587>.
- Seoane, J.C.S., Arantes, R.C.M., Castro, C.B., 2012. Benthic habitat mapping at Recife de Fora, Brazil: imagery and GIS. Proceedings of the 12th International Coral Reef Symposium. Cairns, Australia, pp. 1–5.
- Silva, A.C.R. de S., 2016. Hidrodinâmica do estuário do rio Buranhem, Porto Seguro - Bahia. Universidade Federal de Itajubá.
- Takesue, R.K., Storlazzi, C.D., 2017. Sources and dispersal of land-based runoff from small Hawaiian drainages to a coral reef: insights from geochemical signatures. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 188, 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2017.02.013>.
- Takesue, R.K., Bothner, M.H., Reynolds, R.L., 2009. Sources of land-derived runoff to a coral reef-fringed embayment identified using geochemical tracers in nearshore sediment traps. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 85, 459–471. <https://doi.org/10.1016/j.ecss.2009.09.014>.
- Umezawa, Y., Miyajima, T., Koike, I., 2008. Stable nitrogen isotope composition in sedimentary organic matter as a potential proxy of nitrogen sources for primary producers at a fringing coral reef. *J. Oceanogr.* 64, 899–909. <https://doi.org/10.1007/s10872-008-0074-5>.
- Volkman, J.K., 1986. A review of sterol markers for marine and terrigenous organic matter. *Org. Geochem.* 9, 83–99.
- Wilkinson, C., 2008. Status of coral reefs of the world: 2008. Status Coral Reefs World 2008, pp. 5–19.
- Writer, J.H., Leenheer, J.A., Barber, L.B., Amy, G.L., Chapra, S.C., 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi river as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Water Res.* 29, 1427–1436.
- Zilberberg, C., Abrantes, D.P., Marques, J.A., Machado, L.F., Marangoni, L.F. de B., 2016. Conhecendo os recifes brasileiros: rede de pesquisas Coral Vivo. Serie Livros Museu Nacional, Rio de Janeiro.