

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE - FURG
PÓS-GRADUAÇÃO EM OCEANOGRAFIA BIOLÓGICA**

**BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS DO COBRE NO CORAL *MUSSISMILIA
HARTTII* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae)**

LAURA FERNANDES DE BARROS MARANGONI

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

Orientador: Dr. Adalto Bianchini

**RIO GRANDE
Janeiro / 2014**

Aos recifes de coral,
meu eterno objeto de estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Heloísa e Gutemberg, e à minha irmã Liana, por todo o incentivo, paciência, compreensão, companheirismo e confiança durante todo o processo de realização deste trabalho.

Ao meu orientador, o prof. Dr. Adalto Bianchini, um grande exemplo de homem e pesquisador. Agradeço a oportunidade e confiança que me possibilitaram a realização de um sonho.

Agradeço ao Instituto de Ciências Biológicas, em nome do atual diretor prof. Dr. Adalto Bianchini, por toda a infraestrutura oferecida; ao Josencler Ferreira, Thais Lopes, Glauce Gouveia e Loraine Moraes pelo apoio técnico; aos queridos companheiros de laboratório Lygia Nogueira, Roberta Klein, Martina Prazeres, Indianara Barcarolli, Abel Machado, Flávio Rodrigues, Marina Giacomini, e as Marianas Jorge e Lauer, por terem compartilhado comigo muitas experiências, ideias e conhecimento.

À FURG eu agradeço pela infraestrutura e disponibilização de recursos; e ao Programa de Pós-graduação em Oceanografia Biológica pela bolsa de mestrado concedida.

Agradeço ao projeto Coral Vivo, em nome dos coordenadores Clovis Barreira e Castro e Débora Pires, bem como aos patrocinadores Programa Petrobras Ambiental e Arraial d'Ajuda Eco Parque, por todo suporte logístico, infraestrutura e apoio financeiro. Deixo também meus agradecimentos a toda equipe do projeto: Gabriele Lopes Santos, Bruniele Gondim, Mariana Mendes, Romário Silva, Márcio, Bit Conceição, Camila Vieira e Adejane Santos, sem os quais nunca teria sido possível a realização deste trabalho. Em especial, agradeço aos amigos e companheiros de trabalho mesocósmico Emiliano Calderon, Gustavo Duarte, Cristiano Pereira e Antonio Santos, e aos estagiários favoritos Bruna Rosa e Felipe Cavalcante, pela convivência e ajuda nos momentos previstos e imprevistos.

À minha pequena grande parceira de trabalho e, principalmente amiga, Joseane Aparecida Marques, com a qual dividi inúmeros momentos de dificuldade e muito trabalho (mas muito mesmo!), assim como momentos de muita alegria, amizade e bom humor durante nosso inesquecível “intercâmbio baiano”. Ninguém melhor do que você, Josi, para eu dividir tudo isso!

Às minhas queridas amigas Michele, Barbara, Florência, Thaís, Lumi, Heloisa, Elisa. Andriellie, Dédi, Camila e Jannine, grandes companheiras em momentos de alegria e dificuldade, por fazerem minha vida no Cassino mais feliz. À querida amiga de longa data Laís Donini Abujamara, por ter me ajudado muito desde o primeiro momento em que cheguei a Rio Grande. Obrigada, “minas”, pelos momentos de diversão e reflexão!

Ao meu amado companheiro Samuel, por contribuir e tornar mais leve o processo de finalização deste trabalho, com toda sua paciência, amizade e compreensão.

ÍNDICE

RESUMO.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	6
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
4. SÍNTESE DOS RESULTADOS.....	25
5. CONCLUSÕES.....	29
6. REFERÊNCIAS.....	30
7. ANEXO: Manuscrito a ser submetido ao periódico <i>Aquatic Toxicology</i>	41

RESUMO

Os recifes de coral são um ecossistema dependente da interação mutualística entre corais e dinoflagelados endossimbiontes, sendo altamente sensível às interferências antrópicas e mudanças climáticas. Para um maior entendimento do impacto biológico de estressores relacionados à contaminação química em recifes brasileiros, avaliou-se o efeito do cobre (Cu) sobre parâmetros associados ao estado oxidativo, à calcificação e à eficiência fotossintética no coral *Mussismilia harttii*. Foram analisados os seguintes biomarcadores: potencial fotoquímico máximo do fotossistema II (F_v/F_m), capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), peroxidação lipídica (LPO), dano ao DNA e atividade da anidrase carbônica (AC) e da $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase em corais mantidos sob condição controle (3,0 $\mu\text{g/L}$ Cu) ou expostos a diferentes concentrações subletais de cobre (3,8-8,6 $\mu\text{g/L}$) por até 12 dias em água do mar (25.5°C, salinidade 36‰ S e pH 8,3). A F_v/F_m dos corais não foi afetada pela exposição ao Cu. Porém, a exposição por 12 dias ao Cu causou uma diminuição da ACAP e um aumento no dano ao DNA, efeitos estes dependentes da concentração de Cu no meio. Por outro lado, não foi observado efeito do Cu sobre a LPO. A exposição aguda (4 dias) ao Cu reduziu a atividade da AC, porém esta atividade foi recuperada ao longo do experimento, sugerindo a existência de uma resposta compensatória. Por sua vez, a atividade da $\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+}$ -ATPase foi reduzida após 12 dias de exposição ao Cu, sugerindo um efeito subcrônico. Esses resultados indicam que a exposição ao Cu causa estresse oxidativo e aumenta a susceptibilidade de *M. harttii* ao branqueamento, bem como pode diminuir a taxa de calcificação e, portanto, de crescimento destes corais.

Palavras-chave: coral, biomarcadores, cobre, calcificação, estresse oxidativo, fotossíntese.

1. INTRODUÇÃO

Os recifes de coral são um dos ecossistemas mais produtivos e biologicamente diversos do mundo, contribuindo significativamente para as características físicas e ecológicas de zonas costeiras (Downs et al, 2000; Bielmyer et al, 2010; Bertucci, et al, 2013). Além de representarem um habitat essencial para uma grande variedade de animais marinhos, são também de extrema importância social e econômica, sendo considerados um dos ecossistemas mais valiosos do mundo em termos ecológicos, econômicos e de capital cultural (Jameson et al., 2002; Wilkinson, 2002; Bielmyer et al., 2010). Ainda, os recifes de coral encontram-se entre os ambientes mais frágeis e ameaçados do planeta (Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2011), sendo que o desequilíbrio em processos ecológicos pode afetar os organismos residentes, bem como os seres humanos que dependem desses ecossistemas (Peters et al., 1997).

Infelizmente, grande parte dos recifes de coral do mundo está excessivamente explorada pelo homem e impactada pela poluição, sedimentação excessiva e desenvolvimento urbano e industrial desenfreado na costa. Trabalhos recentes indicam que aproximadamente 65% dos recifes de coral do mundo estão diretamente ameaçados por atividades humanas (Hoegh-Guldberg, 1999; Wilkinson, 1999; Goreau et al., 2000). Estimativas relatam que 19% dos recifes do mundo já se encontram destruídos e que os remanescentes apresentam-se em contínuo declínio, sendo prevista uma destruição massiva destes ambientes nas próximas décadas, devido à intensificação das mudanças climáticas globais e pressões antrópicas (Wilkinson, 2008).

A formação dessas extraordinárias estruturas ecológicas resulta, basicamente, da interação mutualística entre corais esclerectíneos e dinoflagelados endossimbiontes *Symbiodinium* spp., comumente referidos como zooxantelas (Downs et al., 2000; Bielmyer et al., 2010; Bertucci et al., 2013); e da calcificação, processo de formação de um esqueleto externo por meio da transformação de carbono inorgânico dissolvido em carbonato de cálcio (CaCO_3), sob a forma de aragonita (Bertucci et al., 2013).

Corais são organismos muito suscetíveis a mudanças nas condições ambientais, apresentando estreitas faixas de tolerância às variações destas condições, tais como temperatura e qualidade da água (Peters et al., 1997). Sob estresse, esses organismos podem sofrer branqueamento, um fenômeno caracterizado pela perda das zooxantelas ou degradação dos pigmentos fotossintetizantes dessas microalgas (Downs et al., 2000; Douglas, 2003). Tornam-se totalmente branqueados quando há redução de 70 a 90% na densidade de microalgas, manifestando a cor do esqueleto de CaCO_3 subjacente ao tecido, uma vez que este se torna translúcido na ausência do pigmento de seus endossimbiontes (Douglas, 2003). Danos a essa relação simbiótica podem provocar alterações na estrutura das comunidades recifais, uma vez que a capacidade fotossintética, crescimento e capacidade reprodutiva dos corais são afetados (Brown, 1997). Dependendo da intensidade e duração do estresse, os corais podem se recuperar após o branqueamento, mas podem morrer se a recolonização pelas algas não ocorrer de forma rápida (Bielmyer et al., 2010). É importante salientar que o número de episódios de branqueamento em corais aumentou drasticamente desde a década de 80 (Baker et al., 2008) e as previsões é de que estes se tornarão cada vez mais frequentes.

O Brasil possui o único complexo recifal do Atlântico Sul, sendo que seus recifes apresentam características peculiares com respeito à forma de crescimento, morfologia e fauna coralina construtora, a qual apresenta baixa diversidade, alto endemismo e ausência de esclarectínios ramosos (Castro, 1994; Leão, 2002). Dentre as espécies recorrentes, destacam-se aquelas do gênero endêmico *Mussismilia*, por possuírem importante papel na construção dos recifes brasileiros (Castro, 1994; Leão, 2002). Por isso, é notória a grande importância ecológica dos organismos deste gênero. Atualmente, os recifes costeiros no Brasil se apresentam claramente sob estresse, uma consequência direta do desenvolvimento urbano na zona costeira, turismo marinho, exploração de recursos naturais e poluição industrial (Leão, 2002; Leão & Kikuch, 2005). Estudos realizados na região do banco dos Abrolhos, uma expansão de aproximadamente 45.000 km² da plataforma continental do sul da Bahia, demonstraram um aumento na incidência de doenças e taxa de mortalidade na espécie endêmica *Mussismilia braziliensis* (Francini-Filho et al., 2008; Garcia et al., 2013), o que sugere, então, uma diminuição acentuada na cobertura de corais nos próximos 50 anos (Francini-Filho et al., 2008).

Um cenário de múltiplos estressores é composto pelos crescentes impactos gerados pelas atividades humanas combinados à mudanças climáticas. Um número significativo de estudos busca elucidar o efeito de contaminantes ambientais em corais (Nystrom et al., 2001; Grant et al., 2003; Reichelt-Brushett & McOrist, 2003; Ferrier-Pagès et al., 2005; Mitchelmore et al., 2007; Shafir et al., 2007; Sabdono, 2009; Venn et al., 2009; Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2010, 2011; Yost et al., 2010; Rotchell & Ostrander, 2011; Houlbrèque et al., 2012; Schwarz et al., 2013), sendo os metais uma causa de estresse

fisiológico, em muitos casos associado ao branqueamento de corais. Com relação ao cobre, embora este seja um metal traço essencial à manutenção celular e ao funcionamento de uma série de enzimas, ele pode se tornar tóxico quando encontrado em altas concentrações no ambiente aquático (Liu et al., 2006). Em casos mais severos, a contaminação por este metal pode causar a mortalidade de invertebrados aquáticos devido a uma interferência no funcionamento metabólico (Rainbow, 2002). As fontes de contaminação ambiental pelo cobre incluem as tintas anti-incrustantes utilizadas em navios, descargas de esgoto doméstico e de atividades industriais, tornando este metal um poluente comum no ambiente marinho, inclusive nos recifes de coral. Contudo, não existe ainda qualquer estudo sobre o efeito de contaminantes químicos, como o cobre, sobre a fauna coralina brasileira.

Biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas nos fluídos corporais, células ou tecidos indicativas da exposição a concentrações sub-letais de poluentes ambientais, detectadas desde o nível molecular ao sistêmico (Livingstone 1993; Walker et al., 1996). A simbiose entre corais e zooxantelas, bem como o processo de calcificação em corais escleractínios, são características fisiológicas que se revelam interessantes biomarcadores da saúde de corais. Segundo Prazeres et al. (2012), os biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo têm excelente potencial para o prognóstico da saúde do ambiente recifal. Estas ferramentas biológicas permitem uma certa previsibilidade do futuro estado de saúde dos recifes de coral frente a eventos de estresse local e até mesmo de escala global, uma vez que a resposta de biomarcadores associados a danos celulares, tais como a capacidade antioxidante e peroxidação lipídica, possuem uma estreita correlação com o branqueamento/mortalidade de corais (Prazeres et al., 2012).

O estresse oxidativo caracteriza-se por um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) a níveis que excedem a capacidade antioxidante do organismo, levando a uma perturbação na sinalização e no controle redox (Sies & Jones, 2007). Este tipo de estresse é responsável por danos às biomoléculas, uma vez que induz efeitos deletérios e altera estruturas e/ou funções biológicas (Hicks et al., 2006). As ERO resultam da redução parcial do oxigênio a água (Hermes-Lima et al., 2001), sendo em grande parte produzidas nas cadeias transportadoras de elétrons na mitocôndria, retículo endoplasmático, membranas nucleares e no sistema fotossintético (Lushchak, 2011). Estas substâncias são consideradas a classe mais importante de espécies radicais geradas em sistemas biológicos (Miller et al., 1990).

Um dos mais bem compreendidos sistemas relacionados ao estresse oxidativo em invertebrados marinhos emerge da relação simbiótica entre cnidários e zooxantelas (Lesser, 2006). Em corais, o estresse oxidativo causado pela temperatura, radiação UV e contaminantes químicos tem sido identificado através da presença de danos em lipídios, proteínas e DNA (Downs et al., 2000, 2002; Rotchell & Ostrander, 2011; Downs et al., 2013; Schwarz et al., 2013). Dependendo da intensidade do estressor e da capacidade dos mecanismos de reparo, este estresse pode inclusive levar à morte celular (Rotchell & Ostrander, 2011). Uma vez que os cloroplastos experimentam condições de hiperoxia, estes são consequentemente suscetíveis ao estresse oxidativo, o qual pode afetar o fotossistema II (PSII) e a enzima rubisco (Lesser, 2006). Neste caso, a capacidade fotossintética das zooxantelas pode ser reduzida. Ainda, deve-se considerar o fato de que o estresse oxidativo afeta o equilíbrio da associação coral-simbionte, na qual o oxigênio fotossintético gerado

pelas microalgas é difundido para as células do hospedeiro (Rotchell & Ostrander, 2011), podendo assim aumentar os danos oxidativos neste último.

Alguns modelos que abordam mecanismos celulares e moleculares têm sido propostos para explicar o branqueamento em corais. Sugere-se que o estresse oxidativo está envolvido neste processo, uma vez que muitos fatores ambientais associados à sua ocorrência podem induzir o aumento da produção de ERO. Em determinado grau de estresse e dano oxidativo, os corais erradicariam a fonte dominante de produção de ERO, expulsando assim seus endossimbiontes (Downs et al., 2002). Desta forma, existe a hipótese de que o branqueamento é uma resposta final de defesa contra o estresse oxidativo, e que a capacidade de recuperação do organismo dependeria da intensidade do estresse (Downs et al., 2002).

A taxa de crescimento em corais tem sido relatada como sendo um indicador eficiente da saúde de recifes de coral. Neste caso, taxas de calcificação reduzidas refletiriam uma diminuição da taxa fotossintética pelas zooxantelas e/ou mudanças em atividades enzimáticas (Moya et al., 2008). A anidrase carbônica (AC) é uma metaloenzima que catalisa a reação de hidratação reversível do CO_2 em bicarbonato (Moya et al., 2008; Bertucci et al., 2013), sendo essencial aos corais na aquisição de carbono inorgânico, o qual é utilizado pelas zooxantelas na fotossíntese e pelo hospedeiro na calcificação (Furla et al., 1998, 2000; Bertucci et al., 2013). Considerando o papel central da AC na fisiologia de corais, é esperado que variações nos parâmetros ambientais possam afetar a expressão gênica e/ou atividade desta enzima. De fato, experimentos demonstram que inibidores da AC causam uma diminuição na taxa de calcificação (Al-Horani et al., 2003; Bertucci et al., 2013), e que a atividade desta enzima é um biomarcador sensível à exposição de corais a metais (Bielymyer et al., 2010).

A Ca^{2+} -ATPase é uma enzima que participa do transporte de cálcio (Ca^{2+}) para o sítio de calcificação, ao mesmo tempo em que remove prótons deste sítio, direcionando a reação de calcificação ($\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + 2\text{H}^+$) no sentido da formação de CaCO_3 (Al-Horani et al., 2003). Está descrito que a atividade da Ca^{2+} -ATPase está relacionada à manutenção do pH alcalino ($>8,2$), a qual ocorre por meio do funcionamento das bombas de cálcio (Zoccola et al., 2004; Bertucci et al., 2013), que contribuem para a difusão de CO_2 para o sítio de calcificação, garantindo assim a eficiência do processo (Sandeman, 2008). Embora pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos neste processo em corais, é relatado que a manutenção de baixas concentrações intracelulares de Ca^{2+} garante o funcionamento celular adequado nestes organismos (Allison et al., 2011). Portanto, existe a hipótese de que a Ca^{2+} -ATPase possui um papel fundamental na calcificação em corais (Al-Horani et al., 2003), uma vez que altas temperaturas podem causar danos na atividade desta enzima, levando a um aumento da concentração intracelular de Ca^{+2} e ocasionando o branqueamento em corais (Sandeman, 2006).

Por outro lado, são poucas as investigações acerca da função da Mg^{2+} -ATPase na calcificação em corais, embora essa enzima já tenha sido isolada de tecidos desses animais (Ip & Lim, 1991). Propõe-se que a liberação controlada no tempo e no espaço do magnésio (Mg^{2+}) nas superfícies mineralizantes desempenhe um papel chave na formação de esqueletos de coral, podendo o Mg^{2+} ser utilizado para controlar ativamente o crescimento dos diferentes componentes esqueléticos (Meibom et al., 2004). Acredita-se, ainda, que esta enzima possa ser responsável pela diminuição da concentração de Mg^{2+} do fluido de calcificação coralino, uma vez que a concentração desses íons em relação ao Ca^{2+} é reduzida (Allison et al., 2011).

Segundo Meibom et al. (2004), o Mg^{2+} pode ser bombeado ativamente através da ectoderme calicoblástica, ou seja, a ectoderme aboral em contato com o esqueleto, para a superfície de mineralização, ou ainda ser disponibilizado pelo contato direto da água do mar com a zona de mineralização, tal como tem sido observado em foraminíferos (Erez, 2003; Bentov & Erez, 2006).

Considerando a ausência de estudos relacionados à fisiologia de espécies coralinas endêmicas no Brasil, a utilização de biomarcadores para avaliar o efeito da exposição ao cobre no coral *Mussismilia harttii*, uma espécie fundamental na construção dos recifes brasileiros, mostra-se apropriada e necessária. Um maior entendimento sobre as implicações da exposição ao cobre na fisiologia dessa espécie pode fornecer subsídios para prevenção, reabilitação e conservação dos recifes de corais no Brasil, atualmente sujeitos às mudanças climáticas globais e aos impactos locais causados por atividades antrópicas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Objetivou-se avaliar o efeito do cobre em biomarcadores fisiológicos e bioquímicos no coral escleractínio *Mussismilia harttii*.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de cobre ambientalmente relevantes sobre potencial fotoquímico máximo do fotossistema II dos endossimbiontes do coral escleractínio *M. harttii*.
- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de cobre ambientalmente relevantes sobre a atividade específica de enzimas relacionadas ao processo de calcificação [anidrase carbônica e $(\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+})\text{-ATPase}$] e parâmetros associados ao estresse oxidativo (capacidade antioxidante, peroxidação lipídica e dano no DNA) no coral escleractínio *M. harttii*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Caracterização do mesocosmo marinho e implementação da estrutura para ensaios ecotoxicológicos

O mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo, localizado em Arraial d'Ajuda (BA), caracteriza-se por um sistema experimental aberto que troca água permanentemente com o mar, mantendo no meio experimental variações diárias e sazonais de parâmetros ambientais como temperatura, pH, turbidez, salinidade, fase e irradiância lunar, concentração de nutrientes e plâncton, fotoperíodo, chuva, entre outros. A água do mar é captada a 500 m da costa em uma franja recifal adjacente (Praia de Araçaípe) e é bombeada para cisternas subterrâneas, nas quais tratamentos podem ser aplicados, como aumento da temperatura, redução do pH, entre outros. Um sistema computadorizado controla os tratamentos aplicados permitindo valores constantes ou variações temporais (em geral senoidais) de parâmetros da água captada.

Junto a esse sistema, implementou-se uma estrutura destinada à realização de ensaios ecotoxicológicos utilizada no presente estudo, visando a realização de experimentos com diferentes concentrações de cobre. A estrutura possui 48 aquários de 10 L que recebem água das cisternas subterrâneas por meio de 16 bombas peristálticas com $500 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Esta água recebe diluição de 10% de soluções estoque (com contaminantes) de oito reservatórios de 1000 L, a qual é realizada *in line* por outras 16 bombas peristálticas de $150 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$. Desta forma, a taxa de renovação de água nos aquários é de 3 vezes/hora. O descarte da água utilizada é feito por meio de filtros de carvão ativado. Com a estrutura disponível, é possível serem combinadas 4 diluições x 4 tratamentos das cisternas (16 tratamentos), sendo que os

tratamentos podem ser realizados em triplicata. O sistema dos aquários mantém variações diárias e sazonais dos parâmetros ambientais, bem como iluminação natural atenuada por tela Sombrite® 70% atingindo irradiância máxima ($250 \mu\text{mol.fótons.m}^{-2}\text{s}^{-1}$) equivalente a 2,5 m de profundidade no Recife de Fora (Porto Seguro, BA).

Coleta, preparação e manutenção do material biológico

Foram coletados fragmentos de seis colônias do coral *M. harttii*, por meio de mergulho autônomo, na área de preservação do Parque Natural Municipal do Recife de Fora, Porto Seguro, BA ($16^{\circ}25'08,1'' \text{ S} / 38^{\circ}58'54,1'' \text{ W}$) em julho de 2012. Após realizada a coleta, os organismos foram transportados para a base do Projeto Coral Vivo, localizada no distrito de Arraial d'Ajuda, Porto Seguro, BA. Para a realização do experimento, 60 pólipos pertencentes aos fragmentos das colônias de *M. harttii* foram individualizados, colados em placas de cerâmica com cianoacrilato e aclimatados por 20 dias às condições do mesocosmo marinho antes dos experimentos de exposição ao cobre.

Exposição ao cobre

Os organismos foram expostos a 4 diferentes concentrações nominais de cobre (0, 1, 3 e $5 \mu\text{g.L}^{-1}$), por até 12 dias. A exposição foi realizada utilizando-se a estrutura implementada no mesocosmo marinho localizada na base do projeto Coral Vivo. Foram utilizados 12 aquários, onde 60 pólipos oriundos de 6 diferentes colônias foram dispostos aleatoriamente, o que totalizou 5 pólipos por aquário. Soluções-mãe de cobre a partir de uma solução padrão de CuCl_2 (1 g Cu.L^{-1}) foram diariamente preparadas para a obtenção dos meios contaminados

com cobre. Tais soluções foram preparadas em reservatórios de 1000 L contendo água do mar bombeada a partir do recife de coral adjacente. Estas preparações foram efetuadas 24 h antes das soluções serem utilizadas nos experimentos, visando uma completa estabilização do cobre com a água do mar. Nos reservatórios destinados aos diferentes tratamentos com cobre foram adicionados 10, 30 e 50 mL da solução padrão de 1 g Cu.L^{-1} , objetivando-se atingir as concentrações nominais finais de 10, 30 e 50 $\mu\text{g Cu.L}^{-1}$, respectivamente. Uma vez que 10% do fluxo dos aquários foi proveniente de tais reservatórios, a expectativa era de que as concentrações nominais nos aquários de teste fossem de 0, 1, 3 e 5 $\mu\text{g Cu.L}^{-1}$ acima daquela já existente naturalmente no ambiente. Para os tratamentos controle, a água bombeada do recife também foi mantida em reservatório com antecedência de 24 h de sua utilização nos experimentos.

Pólipos ($n = 3$ por tratamento) dos aquários teste foram coletados no início (tempo 0) e após 4, 8 e 12 dias do início do experimento. As amostras foram acondicionadas em tubos criogênicos (5 mL) e congeladas em nitrogênio líquido para análises posteriores dos biomarcadores. Paralelamente ao início do experimento, pólipos pertencentes às mesmas 6 colônias das quais foi coletado o material biológico utilizado no experimento foram coletados e armazenados nas mesmas condições supracitadas, com o intuito de se obter uma referência de campo para se averiguar a adequação do processo de aclimação aplicado.

Análise da concentração de cobre dissolvido na água

Amostras de água dos reservatórios e dos aquários de teste de cada tratamento foram coletadas a cada 3 dias ao longo dos 12 dias de experimento para análise e monitoramento da

concentração de cobre. Também foram coletadas amostras de água do Recife de Fora no momento da coleta dos corais, bem como da região próxima à captação de água do mesocosmo marinho. Amostras não filtradas e filtradas (filtro de 0,45 μm de malha) foram coletadas em tubos Falcon (15 mL) e acidificadas (HNO_3 1%) para determinação da concentração de cobre total (amostra não filtrada) e cobre dissolvido (amostra filtrada). As amostras foram dessalinizadas, conforme descrito por Nadella *et al.* (2008) para posterior análise da concentração de cobre por espectrofotometria de absorção atômica com forno de grafite acoplado (Perkin-Elmer, EUA).

Potencial fotoquímico máximo do fotossistema II (F_v/F_m)

Estudos fisiológicos em organismos fotossintetizantes permitem a avaliação do processo fotossintético, o qual serve como indicador da saúde do organismo em análise. Neste contexto, a performance fotossintética máxima do fotossistema II (F_v/F_m), obtida por medidas de fluorescência da clorofila *a*, tem sido utilizada como um indicador do estado fisiológico de organismos fotossintetizantes e de invertebrados dotados de simbioses com capacidade fotossintética, assim como os corais (Yellowlees *et al.* 2003; Rennenberg *et al.*, 2006; Waring *et al.*, 2006; Slama *et al.*, 2007; Chaloub *et al.* 2010; Higuchi *et al.*, 2013).

Para avaliar o efeito do cobre sobre a F_v/F_m dos holobiontes, foi analisado aleatoriamente um pólipos de cada aquário teste, no qual foi realizada a medida da capacidade fotossintetizante utilizando-se um fluorímetro de pulso de amplitude modulada (Diving-PAM; Walz, Alemanha). As medições foram realizadas no final do período de aclimação (pré-tratamento) e após 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias de experimento. O nível de fluorescência mínima (F_0) foi obtido por uma sonda fraca de luz modulada, enquanto o nível máximo de fluorescência (F_m) foi detectado após um pulso de saturação de luz actínica. A fluorescência

variável (F_v) foi calculada como $F_m - F_0$, e o potencial fotoquímico máximo do fotossistema II foi obtido por meio da razão de F_v/F_m . Para a realização da medida dos níveis mínimo e máximo da fluorescência, visando a obtenção dos valores de F_v/F_m , os pólipos foram submetidos a um período de aclimação ao escuro. Isto foi necessário para que o fotossistema II estivesse momentaneamente fora de atividade, garantindo que toda a fluorescência remanescente da clorofila *a*, originária do processo fotossintético desenvolvido até então, tivesse se dissipado, e que os centros de reação estivessem com o potencial de realizar sua fotoquímica máxima (Macedo, 2007). Os valores de fluorescência (Yield) foram considerados medidas do estado de saúde dos dinoflagelados endossimbiontes (zooxantelas) que fazem parte do holobionte.

Preparação das amostras e análise dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo e à calcificação

A preparação das amostras de corais para análise dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo e ao processo de calcificação nos corais foi realizada conforme descrito por Downs (2005), com algumas modificações. As amostras foram maceradas em nitrogênio líquido e alíquotas de 150-200 mg foram homogeneizadas (1:2; massa/volume) em tampão de homogeneização específico para cada ensaio com auxílio de um sonicador (Sonaer, EUA). As amostras homogeneizadas foram então centrifugadas (13 000 *g*, 10 min, 4°C) e o sobrenadante coletado para as análises, sendo imediatamente utilizado para as medidas de atividade enzimática [(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase e anidrase carbônica]. Os sobrenadantes destinados a análises de biomarcadores associados ao estresse oxidativo [capacidade

antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP), peroxidação lipídica (LPO) e dano no DNA] foram mantidos em ultrafreezer (-80°C) por, no máximo, 1 semana, antes da realização das análises. A quantificação de proteínas totais nas amostras homogeneizadas foi realizada utilizando-se um kit comercial de reagentes baseado no método de Bradford (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, EUA).

Capacidade antioxidante total contra radicais peroxil (ACAP)

A ACAP é uma medida da resistência do organismo contra várias formas de oxiradicais e, portanto, prevê os efeitos adversos destes compostos na condição fisiológica do organismo (Regoli, 2000). No presente estudo, a ACAP foi medida fluorimetricamente seguindo os procedimentos descritos por Amado et al. (2009), com algumas modificações. O protocolo utilizado baseia-se na detecção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por fluorimetria (excitação: 485 nm; emissão: 530 nm) com o uso de 2',7' diclorofluorescina (H₂DCF-DA) como substrato, e a geração de radicais peroxil por decomposição térmica do composto 2,2'-azobis (ABAP). A concentração de proteínas no homogeneizado foi padronizada em 0,05 mg.L⁻¹ para se obter o melhor sinal e ajuste da curva de dados de fluorescência ao longo do tempo.

Uma placa de 96 poças foi preparada com as amostras em triplicata para a medida da fluorescência na presença e na ausência de ABAP (40 mM). Nas poças para leitura com e sem ABAP foi adicionado o substrato (H₂DCF-DA) na concentração final de 16 µM. A medida da fluorescência foi realizada em leitora de microplacas (Victor 2, Perkin Elmer, EUA) em intervalos de 5 min, durante 60 min, a 37°C. A ACAP foi determinada pela

diferença dos valores de fluorescência obtidos nas áreas com e sem ABAP. Os resultados de ACAP foram expressos considerando o inverso da área relativa entre a área com ABAP e a diferença entre a área com e sem ABAP.

Peroxidação lipídica (LPO)

A peroxidação lipídica foi determinada utilizando-se o método fluorimétrico descrito por Oakes e Van Der Kraak (2003), o qual está baseado na medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Esta metodologia quantifica os danos peroxidativos em lipídios por meio da reação do malondialdeído (MDA), um dos produtos da peroxidação lipídica, com o ácido tiobarbitúrico (TBA) em meio ácido a 95°C. Esta reação gera o tetrametoxipropano (TMP), um cromógeno que pode ser medido por espectrofluorimetria (excitação: 515 nm; emissão: 553 nm). Os resultados de LPO foram normalizados considerando o conteúdo de proteínas nas amostras e expressos em nmol MDA/mg proteína.

Dano no DNA

Os sítios apurínicos/apirimídicos (AP) são um dos principais tipos de lesão no DNA que ocorrem durante mecanismos de reparo, como a excisão de base e reparação de bases oxidadas, desaminadas e alquiladas. Por isso, a quantificação de sítios AP pode ser considerada um bom indicador dos níveis de lesões e reparo no DNA contra danos químicos. Primeiramente, realizou-se o isolamento do DNA genômico das amostras utilizando-se o kit comercial de reagentes "DNA Isolation Kit" (PromoKine, Promocell, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente, foi feita a análise para detecção de dano no DNA utilizando-se o

kit comercial de reagentes "DNA Damage Detection Kit" (PromoKine, Promocell, Heidelberg, Alemanha). Neste caso, uma sonda reativa de aldeído reage especificamente com um grupo aldeído que dá acesso aos sítios AP. Estes foram quantificados por colorimetria (450 nm). Os resultados foram normalizados considerando a quantidade total de proteínas nas amostras e expressos em sítios AP/mg proteína.

Atividade da anidrase carbônica (AC)

A determinação da atividade da AC foi realizada conforme o método descrito por Henry (1991), com algumas modificações. Este método baseia-se na medida da redução de pH devido à catálise da hidratação do CO₂, com a correspondente liberação de H⁺. O tampão utilizado para homogeneização das amostras foi constituído por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), inibidor de proteases (PMSF 1 mM) e ditritiotreitol (DTT 1 mM). Para isso, 10 µL do homogeneizado foram adicionados a 2 mL de uma solução de reação composta por Tris-Base (10 mM, pH 8,5), sacarose (75 mM), manitol (225 mM) e fosfato (10 mM). Em seguida, foram adicionados 260 µL de substrato (água destilada saturada com CO₂) e o pH foi registrado a cada 5 s, durante 30 s, com o auxílio de um pHmetro (pHmetro de bancada pH 21, Hanna). Paralelamente foram realizadas determinações do branco, em que 10 µL do tampão de homogeneização foram adicionados à solução de reação e ao substrato. Foi utilizado o modelo de regressão linear (variável dependente: pH, variável independente: tempo) para estimar a declividade das retas de reação. A média dos dados obtidos a partir dos homogeneizados representa a taxa de reação catalisada, enquanto que a média dos dados obtidos nos brancos indica a taxa não catalisada. Os resultados foram normalizados

considerando a quantidade de proteínas totais nas amostras e foram expressos em unidades de AC/mg proteína.

Atividade da (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase

A atividade da (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase foi determinada utilizando-se o método descrito por Vajreswari et al. (1983), com algumas modificações. O homogeneizado foi preparado com tampão composto por Tris-HCl (100 mM, pH 7,6), sacarose (500 mM), DTT (1 mM) e PMSF (1 mM). O homogeneizado foi centrifugado (20 min, 10.000 *g*, 4°C) e 20 µL do sobrenadante foram utilizados para a análise. O meio de reação utilizado na análise foi composto por NaCl (80 mM), MgCl_2 (5 mM), CaCl_2 (0.5 mM) e Tris-HCl (20 mM, pH 7,6) e a incubação feita a 30 °C. A concentração de fosfato inorgânico liberada pela atividade da enzima no meio de reação foi estimada utilizando-se o método colorimétrico descrito por Fisk e Subbarow (1925). Para isso, foi utilizando o kit comercial de reagentes "Fosfato" (Doles, Goiânia, GO, Brasil) e uma leitora de microplaca (ELX 808, Biotek, Vermont, EUA). A detecção colorimétrica foi realizada a 630 nm. Os resultados foram normalizados considerando a quantidade de proteínas totais nas amostras e foram expressos em mM fosfato inorgânico/mg proteína/min.

Análises estatísticas

Em todos os casos, os dados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. As médias dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo e ao processo de calcificação nos corais coletados em campo foram comparadas com aquelas dos corais aclimatados ao

mesocosmo marinho utilizando-se o teste *t* de Student. Para a análise dos dados de capacidade fotossintetizante (F_v/F_m) foi utilizada a análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, seguida do teste de comparação de médias múltiplas de Fisher. Os efeitos da concentração de cobre e do tempo de exposição sobre os dados dos biomarcadores associados ao estresse oxidativo e ao processo de calcificação foram verificados utilizando-se a ANOVA de duas vias para medidas não repetidas, seguido pelo teste de comparação de médias múltiplas de Fisher. Os pressupostos de normalidade e homogeneidade de variâncias foram previamente verificados. Quando os pressupostos não foram observados, os dados foram transformados matematicamente (logaritmo decimal). Em todos os casos, o nível de significância adotado foi de 95% ($\alpha = 0,05$).

4. SÍNTESE DOS RESULTADOS

Concentração de cobre na água

As concentrações de cobre total e dissolvido nas amostras de água coletadas no Parque Municipal do Recife de Fora (Porto Seguro, BA) e na franja recifal adjacente ao Mesocosmo Marinho (Praia Araçaípe, Arraial d'Ajuda, BA) foram de $3,1 \pm 0,7 \mu\text{g.L}^{-1}$ e $1,8 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, respectivamente. Estes valores estão dentro do esperado para áreas costeiras, que podem variar de acordo com a região, dependendo do *input* antrópico e de ações naturais, enquanto que em regiões oceânicas são encontradas concentrações menores de cobre dissolvido (Chester & Stoner, 1974; Moore, 1978; Villa, 1988; Landing *et al.*, 1995; Bruland & Lohan, 2003; Curtius *et al.*, 2003).

Quanto aos aquários experimentais, as concentrações de cobre total nos tratamentos testados foram de $4,6 \pm 1,3$; $6,3 \pm 1,0$; $7,7 \pm 0,5$; e $10,7 \pm 1,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, para as concentrações nominais de 0 (controle), 1, 3, e $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, respectivamente. Por sua vez, as concentrações de cobre dissolvido nos meios experimentais corresponderam a $3,0 \pm 0,7$; $3,8 \pm 0,8$; $5,4 \pm 0,9$; e $8,6 \pm 0,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, respectivamente. Considerando que a água captada pelo mesocosmo marinho possui naturalmente $\sim 2 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre dissolvido, o gradiente de concentração de cobre dissolvido esperado seria de 2 a $7 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre. De fato, o gradiente de concentração de cobre dissolvido medido nos aquários de teste do mesocosmo marinho foi de 3,0 a $8,6 \mu\text{g.L}^{-1}$, o qual é muito próximo do esperado e ambientalmente relevante para estudos ecotoxicológicos.

Aclimação dos organismos

Não foram observadas diferenças entre os valores médios dos biomarcadores nos corais coletados em campo e imediatamente analisados (referência de campo) e os valores médios dos biomarcadores nos corais aclimatados ao mesocosmo marinho (Tabela 1 do anexo), o que demonstra a adequada aclimação dos organismos antes da submissão dos mesmos aos testes de exposição ao cobre.

Potencial fotoquímico máximo do fotossistema II (F_v/F_m)

O valor de F_v/F_m variou ao longo do tempo experimental em todos os tratamentos testados. Nenhum efeito significativo das diferentes concentrações de cobre sobre o valor de F_v/F_m foi observado nos diferentes tempos experimentais. No entanto, foi observada uma tendência de diminuição no potencial fotoquímico máximo do fotossistema II. Quando os dados dos corais expostos ao cobre foram agrupados, os valores médios de F_v/F_m corresponderam a $0,984 \pm 0,005$; $0,976 \pm 0,006$; $0,979 \pm 0,006$; $0,969 \pm 0,006$; $0,967 \pm 0,006$; e $0,975 \pm 0,008$ após 1, 3, 5, 7, 9 e 11 dias de experimento, respectivamente (Figura 1 do anexo).

Capacidade antioxidante máxima contra radicais peroxil (ACAP)

Após 12 dias de exposição ao cobre, os corais expostos a $3,8 \mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre mostraram uma ACAP significativamente maior do que aqueles expostos à mesma concentração de cobre por um período de tempo menor. Além disso, estes corais mostraram

uma maior ACAP do que aqueles expostos a 5,4 e 8,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre pelo mesmo período de tempo (12 dias) (Figura 2 do anexo).

Peroxidação lipídica (LPO)

Em todos os tratamentos, a LPO aumentou significativamente após 12 dias de experimento. Entretanto, não foi observado um efeito significativo do cobre sobre a LPO em cada tempo experimental (Figura 3 do anexo).

Dano no DNA

Em todos os tratamentos não foi observada alteração significativa do número de sítios AP (dano no DNA) ao longo do tempo experimental. Nos corais expostos ao cobre por 12 dias, o dano no DNA foi maior com o aumento da concentração de cobre no meio experimental, apresentando-se significativamente maior nos corais expostos a 5,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre. Entretanto, não foi possível detectar diferenças significativas entre corais mantidos nas condições controle (3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre) em relação a aqueles expostos a 8,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre por 12 dias (Figura 4 do anexo).

Atividade da enzima anidrase carbônica (AC)

Uma menor atividade da AC foi observada nos corais mantidos sob condições controle após 12 dias de experimento. Esta atividade reduzida também foi observada nos corais expostos por 12 dias a qualquer tratamento com cobre. Entretanto, os corais expostos aos tratamentos de cobre por 4 dias também apresentaram uma reduzida atividade da AC,

efeito este que não foi observado nos corais mantidos nas condições controle. Assim, uma redução significativa na atividade da AC foi observada nos corais expostos a 5,4 e 8,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, em relação àqueles mantidos sob as condições controle (3,0 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre) por 4 dias. Após 8 dias de experimento, a atividade da AC ainda estava significativamente reduzida nos corais expostos a 5,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre, em relação àqueles mantidos sob condições controle (Figura 5 do anexo).

Atividade da enzima (Ca^{2+} , Mg^{+2})-ATPase

Os corais mantidos sob condições controle mostraram uma maior atividade da (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase após 12 dias de experimento. Os corais expostos a 3,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre por 12 dias também mostraram uma atividade enzimática maior do que aqueles expostos à mesma concentração de cobre por 4 dias. Por outro lado, os corais expostos a 8,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre por 12 dias mostraram uma menor atividade da (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase do que aqueles expostos à mesma concentração de cobre por 4 dias. Após 4 dias de experimento, a atividade enzimática foi menor nos corais expostos a 3,8 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre do que naqueles expostos a 8,6 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de cobre. Após 12 dias de exposição, a atividade da (Ca^{2+} , Mg^{2+})-ATPase foi menor nos corais expostos a qualquer uma dos tratamentos de cobre, em relação àqueles mantidos nas condições controle (Figura 6 do anexo).

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados no presente estudo, conclui-se que:

- (1) o mesocosmo marinho demonstrou ser um sistema eficiente para realização de experimentos ecotoxicológicos em corais. Este oferece um ambiente adequado à realização de experimentos de curta e longa duração, com diferentes tratamentos, mantendo as principais características do ambiente natural. Desta forma, a utilização deste sistema viabiliza estudos sob condições mais próximas da realidade do ambiente natural, fator que pode ser considerado de grande relevância ecológica em estudos ecofisiológicos;
- (2) as respostas dos biomarcadores relacionados ao estresse oxidativo (ACAP e dano no DNA) no decurso temporal da exposição ao cobre mostram uma diminuição da capacidade antioxidante e um aumento na ocorrência de danos oxidativos nos corais, o que sugere uma maior susceptibilidade destes a branqueamento e mortalidade quando expostos a outros agentes estressores em combinação com a contaminação da água pelo cobre;
- (3) o efeito do cobre sobre a atividade das enzimas relacionadas à calcificação indica que este metal pode afetar a calcificação em corais e, conseqüentemente, ocasionar a diminuição da taxa de crescimento desses organismos;
- (4) vários biomarcadores analisados no presente estudo (ACAP, dano no DNA e atividade de enzimas) foram sensíveis à exposição a concentrações ambientalmente relevantes de cobre, mesmo antes de uma manifestação visual de branqueamento, sugerindo que estes biomarcadores podem se constituir em importantes ferramentas para a avaliação e o monitoramento da saúde de corais.

6. REFERÊNCIAS

- 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.
- Allison N, Cohen I, Finch AA, Erez, J, EMIF, 2011. Controls on Sr/Ca and Mg/Ca in scleractinian corals: The effects of Ca-ATPase and transcellular Ca channels on skeletal chemistry. *Geochim Cosmochim Acta* 75: 6350-6360.
- Amado LL, Garcia ML, Ramos PB, Freitas RF, Zafalon B, Ferreira JLR, Yunes JS, Monserrat JM, 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. *Sci Total Environ* 407: 2115-2123.
- Baker AC, Glynn PW, Riegl B, 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuar Coast Shelf S* 80: 435-471.
- Bentov S, Erez J, 2006. Impact of biomineralization processes on the Mg content of foraminiferal shells: A biological perspective. *Geochem Geophys Geosyst* 7: Q01P08. DOI: 10.1029/2005GC001015.
- Bertucci A, Moya A, Tambutté S, Allemand D, Supuran CT, Zoccola D, 2013. Carbonic anhydrases in anthozoan corals – A review. *Bioorgan Med Chem* 21: 1437-1450.

- Bielmyer GK, Gosell M, Bhagooli R, Baker AC, Langdon C, Gillette P, Capo TR, 2010. Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium* spp.). *Aquat Toxicol* 97: 125-133.
- Brown BE, 1997. Coral Bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs* 16: 129-138.
- Bruland KW, Lohan MC, 2003. Controls of trace metals in sea water. In: Holland HD, Turekian KK (eds.). *Treatise on Geochemistry*. Elsevier Ltd. UK. pp 23-47.
- Castro CB, 1994. Corals of southern Bahia. In: Hetzel B, Castro CB (eds.). *Corals of southern Bahia*. Nova Fronteira. Rio de Janeiro, pp. 161-176.
- Chaloub RM, Reinert F, Nassar CAG, Fleury BG, Mantuano DG, Larkum AWD, 2010. Photosynthetic properties of three Brazilian seaweeds. *Rev Bras Bot* 33: 371- 374.
- Chester R, Stoner JH, 1974. The distribution of zinc, nickel, manganese, cadmium, copper and iron in some surface waters from the world ocean. *Mar Chem* 2: 17- 32.
- Curtius AJ, Seibert EL, Fiedler HD, 2003. Avaliando a contaminação por elementos traço em atividades de maricultura: resultados parciais de um estudo de campo na Ilha de Santa Catarina, Brasil. *Quim Nova* 1: 44-52.
- Douglas AE, 2003. Coral bleaching — how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46: 385–392.
- Downs C, 2005. Cellular diagnostics and its application to aquatic and marine toxicology. In: Ostrander GK (ed.). *Techniques in Aquatic Toxicology*. CRC press. EUA. pp 181-208.

- Downs CA, Fauth JE, Downs VD, Ostrander GK, 2010. In vitro cell-toxicity screening as an alternative animal model for coral toxicology: effects of heat stress, sulfide, rotenone, cyanide, and cuprous oxide on cell viability and mitochondrial function. *Ecotoxicology* 19: 171-184.
- Downs CA, Fauth JE, Halas JC, Dustan P, Bemiss J, Woodley CM, 2002. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Radical Bio Med* 33: 533-543.
- Downs CA, McDougall KE, Woodley CM, Fauth JE, Richmond RH, Kushmaro A, Gibb SW, Loya Y, Ostrander GK, Kramarsky-Winter E. 2013. Heat-stress and light-stress induce different cellular pathologies in the symbiotic dinoflagellate during coral bleaching. *PLoS One* 8, e77173.
- Downs CA, Mueller E, Phillips S, Fauth JE, Woodley CM, 2000. A molecular biomarker system for assessing the health of coral (*Montastrea faveolata*) during heat stress. *Mar Biotechnol* 2: 533-544.
- Downs CA, Woodley CM, Fauth JE, Knutson S, Burtscher MM, May LA, Avadanei AR, Higgins JL, Ostrander GK, 2011. A survey of environmental pollutants and cellular-stress markers of *Porites astreoides* at six sites in St. John, US. Virgin Islands. *Ecotoxicology* 20: 1914-1931.
- Erez J, 2003. The source of ions for biomineralization in foraminifera and their implications for paleoceanographic proxies. *Rev Mineral Geochem* 54: 115-149.

- Ferrier-Pagès C, Houlbrèque F, Wyse E, Richard C, Allemand D, Boisson F, 2005. Bioaccumulation of zinc in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs* 24: 636-645.
- Fiske CH, Subbarow Y, 1925. The calorimetric determination of phosphorus. *J Biol Chem* LXVI: 375-400.
- Francini-Filho RB, Moura RL, Thompson FL, Reis RM, Kaufman L, Kikuchi RKP, Leão ZMAN, 2008. Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Mar Pollut Bull* 56: 1008-1014.
- Furla P, Galgani I, Durand I, Allemand D, 2000. Sources and mechanisms of inorganic carbon transport for coral calcification and photosynthesis. *J Exp Biol* 203: 3445–3457.
- Furla P, Tambutté SB, Jaubert J, Allemand D, 1998. Diffusional permeability of dissolved inorganic carbon through the isolated oral epithelial layers of the sea anemone, *Anemonia viridis*. *J Exp Mar Biol Ecol* 221: 71-88.
- Garcia GD, Gregoracci GB, Santos EO, Meirelles PM, Silva GGZ, Edwards R, Sawabe T, Gotoh K, Nakamura S, Iida T, de Moura RL, Thompson FL, 2013. Metagenomic analysis of healthy and white plague affected *Mussismilia braziliensis* corals. *Microb Ecol* 65: 1076-1086.

- Goreau TJ, McClanahan T, Hayes R, Strong AE, 2000. Conservation of coral reefs after the 1998 global bleaching event. *Conserv Biol* 14: 5–15.
- Grant AJ, Graham K, Frankland S, Hinde R, 2003. Effect of copper on algal–host interactions in the symbiotic coral *Plesiastrea versipora*. *Plant Physiol Biochem* 41: 383–390.
- Henry RP, 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson SJ, Tashian RE, Gros G, Carters ND (eds.). The carbonic anhydrases: cellular physiology and molecular genetics. Plenum New York. EUA. pp 119-125.
- Hermes-Lima M, Storey JM, Storey KB, 2001. Antioxidant defenses and animal adaptation to oxygen availability during environmental stress. In: Storey KB, Storey JM (Eds.). Cell and Molecular Responses to Stress, vol. 2. Elsevier, Amsterdam. Holanda, pp. 263-287.
- Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS, 2006. Organ preservation. *Methods Mol Biol* 333: 331-374.
- Hicks M, Hing A, Gao L, Ryan J, Macdonald PS, 2006. Organ preservation. *Methods Mol Biol* 333: 331-374.
- Higuchi T, Agostini S, Casareto BE, Yoshinaga K, Suzuki T, Nakano Y, Fujimura H, Suzuki Y, 2013. Bacterial enhancement of bleaching and physiological impacts on the coral *Montipora digitata*. *J Exp Mar Biol Ecol* 440: 54-60.

- Hoegh-Guldberg O, 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar Fresh Res* 50: 839–866.
- Houlbrèque F, Rodolfo-Metalpa R, Jefree R, Oberhansli F, Teyssié J-L, Boisson F, Al-Trabeen K, Ferrier-Pagès C, 2012. Effects of increased $p\text{CO}_2$ on zinc uptake and calcification in the tropical coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs* 31: 101-109.
- Ip YK, Lim ALL, 1991. Are calcium and strontium transported by the same mechanism in the hermatypic coral *Galaxea fascicularis*? *J exp Biol* 159: 507-513.
- Jameson SC, Tupper MH, Ridley JM, 2002. The three screen doors: can marine “protected” areas be effective? *Mar Pollut Bull* 44: 1177–1183.
- Landing WM, Cutter GA, Dalziel JA, Flegal AR, Powell RT, Schimidt D, Shiller A, Statham P, Westerlund S, Resing J, 1995. Analytical intercomparison results from the 1990 Intergovernmental Oceanographic Commission open-ocean baseline survey for trace metals: Atlantic Ocean. *Mar Chem* 49: 253-265.
- Leão ZMAN, 2002. Abrolhos, BA - O complexo recifal mais extenso do Atlântico Sul. In: Schobbenhaus C, Campos DA, Queiroz ET, Winge M, Berbert-Born MLC (Eds.). Sítios geológicos e paleontológicos do Brasil. DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), Brasília, Brasil, pp. 345–359.
- Leão ZMAN, Kikuchi RKP, 2005. A relic coral fauna threatened by global changes and human activities, Eastern Brazil. *Mar Pollut Bull* 51: 599-611.

- Lesser MP, 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu Rev Physiol* 68: 253-278.
- Liu H, Wang W, Zhand J, Wang X, 2006. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Crassius auratus*. *Ecotox Enviromen Safe* 65: 350-354.
- Livingstone DR, 1993. Biotechnology and pollution monitoring: use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *J Chem Tech Biotechnol* 57: 196-211.
- Lushchak VI, 2011. Adaptive response to oxidative stress: Bacteria, fungi, plants and animals. *Comp Biochem Physiol* 153: 175-190.
- Macedo RS, 2007. Efeito do herbicida bentazon sobre o crescimento e a performance fotossintética da diatomácea *Skeletonema costatum*. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação. 65 p.
- Meibom A, Cuif JP, Hillion F, Constantz BR, Juillet-Leclerc A, Dauphin Y, Dunbar RB, 2004. Distribution of magnesium in coral skeleton. *Geophys Res Lett.* 31: L23306. DOI: 10.1029/2004GL021313.
- Miller DM, Buettner GR, Aust SD, 1990. Transition metals as catalysts of “autoxidation” reactions. *Free Rad Biol Med* 8: 95-108.
- Mitchelmore CL, Verde EA, Weis VM, 2007. Uptake and partitioning of copper and cadmium in the coral *Pocillopora damicornis*. *Aquat Toxicol* 85: 48–56.

- Moore RM, 1978. The distribution of dissolved copper in the Eastern Atlantic Ocean. *Earth Planet Sc Lett* 41: 461-468.
- Moya A, Tambutté S, Bertucci A, Tambutté E, Lotto S, Vullo D, Supuran CT, Allemand D, Zoccola D, 2008. Carbonic anhydrase in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*: characterization, localization, and role in biomineralization. *J Bio Chem* 283: 25475- 25484.
- Nadella SD, Fitzpatrick JL, Franklin N, Bucking C, Smith S, Wood CM, 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* 149: 340–348.
- Nystrom M, Nordemar I, Tedengren M, 2001. Simultaneous and sequential stress from increased temperature and copper on the metabolism of the hermatypic coral *Porites cylindrical*. *Mar Biol* 138: 1225-1231.
- Oakes KD, Van Der Kraak GJ, 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat Toxicol* 63: 447-463.
- Peters EC, Gassman NJ, Firman JC, Richmond RH, Power EA, 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystem. *Enviromen Toxicol Chem* 16: 12-40.

- Prazeres MF, Martins SE, Bianchini A, 2012. Assessment of water quality in coral communities from Fernando de Noronha, Brazil: Biomarkers analysis in *Amphistegina lessonii*. *J Foramin Res* 42, 56-65.
- Rainbow PS, 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ Pollut* 120: 497-507.
- Regoli F, 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress: *Aquat Toxicol* 50: 351–361.
- Reichelt-Brushett AJ, McOrist G, 2003. Trace metals in the living and nonliving components of scleractinian corals. *Mar Pollut Bull* 46: 1573-1582.
- Rennenberg H, Loreto F, Polle A, Brilli F, Fares S, Beniwal RS, Gessler A, 2006. Physiological responses of forest trees to heat and drought. *Plant Biol* 8: 556-571.
- Rotchell JM, Ostrander GK, 2011. Molecular toxicology of corals: a review. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 14: 571–592.
- Sabdon A, 2009. heavy metal levels and their potential toxic effect on coral *Galaxea fascicularis* from Java sea, Indonesia. *Res J Environ Sci* 3: 96-102.
- Sandeman IM, 2006. Fragmentation of the gastrodermis and detachment of zooxanthellae in symbiotic cnidarians: a role for hydrogen peroxide and Ca^{2+} in coral bleaching and algal density control. *Rev Biol Trop* 54: 79-96.

- Sandeman IM, 2008. Light driven lipid peroxidation of coral membranes and a suggested role in calcification. *Rev Biol Trop* 56: 1-9.
- Schwarz JA, Mitchelmore CL, Jones R, O'Dea A, Seymour S, 2013. Exposure to copper induces oxidative and stress responses and DNA damage in the coral *Montastraea franksi*. *Comp Biochem Physiol* 157: 272-279.
- Shafir S, Van Rijn J, Rinkevich B, 2007. Short and long term toxicity of crude oil and oil dispersants to two representative coral species. *Environ Sci Technol* 41: 5571–74.
- Sies H, Jones D, 2007. Oxidative stress. In: Fink G. (ed.). Encyclopedia of stress. Elsevier, Academic Press. EUA, 45-48.
- Slama I, Ghnaya T, Messedi D, Hessini K, Labidi N, Savoure A, Abdelly C, 2007. Effect of sodium chloride on the response of the halophyte species *Sesuvium portulacastrum* grown in mannitol-induced water stress. *Journal of Plant Research* 120: 291-299.
- Vajreswari A, Srinivasa Rao P, Kaplay SS, Tulpule PG, 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high uric acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, an $(\text{Na}^+, \text{K}^+)$ – and $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ – ATPases. *Bioch Med* 29:74-84.
- Venn AA, Quinn J, Jones R, Bodnar A, 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat Toxicol* 93: 188-195.

- Villa N, 1988. Spatial Distribution of heavy metals in seawater and sediments from coastal areas of the southeastern Buenos Aires Province, Argentina. In: Sellinger U, Lacerda LD, Patchineelam SR (eds.). Metals in coastal environments of Latin America. Springer-Verlag. Alemanha, pp. 30-44.
- Walker CH, Hopkin SP, Sibly RM, Peakall DR, 1996. Principles of Ecotoxicology. Taylor & Francis, London.
- Waring J, Underwood GJ, Baker NR, 2006. Impact of elevated UV-B radiation on photosynthetic electron transport, primary productivity and carbon allocation in estuarine epipellic diatoms. *Plant Cell Environ* 4: 521-34.
- Wilkinson C, 2002. Status of coral reefs of the world: 2002. Australian Institute of Marine Science, Western Australia, p. 378.
- Wilkinson C, 2008. Status of Coral Reefs of the World: 2008. Global coral reef monitoring network and reef and rainforest research centre. Townsville, Australia, p. 296.
- Wilkinson CR, 1999. Global and local threats to coral reef functioning and existence: review and predictions. *Mar Fresh Res* 50: 867–878.
- Yellowlees D, Warner M, 2003. Photosynthesis in symbiotic algae. In: Photosynthesis in Algae. Larkum AWD, Douglas SE, Raven JA, (Eds.). Advances in photosynthesis and respiration 14. Springer, Dordrecht, pp. 437-455.

- Yost DM, Jones RJ, Mitchelmore CL, 2010. Alterations in dimethylsulfoniopropionate (DMSP) levels in the coral *Montastraea franksi* in response to copper exposure. *Aquat Toxicol* 98: 367-373.
- Zoccola D, Tambutte E, Kulhanek E, Puverel S, Scimeca JC, Allemand D, Tambutte S, 2004. Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *BBA-Biomembranes* 1663: 117–126.

7. ANEXO

Biomarkers responses in the Brazilian coral *Mussismilia harttii*
(Scleractinia, Mussidae) after subchronic exposure to copper

Laura Fernandes de Barros Marangoni, Joseane Aparecida Marques, Gustavo Adolpho Santos Duarte, Cristiano Macedo Pereira, Emiliano Nicolas Calderon, Clovis Barreira e Castro & Adalto Bianchini

Artigo redigido de acordo com as normas para publicação no periódico *Aquatic Toxicology*,
para o qual será submetido.

Biomarkers responses in the Brazilian coral *Mussismilia harttii* (Cnidaria, Scleractinia, Mussidae) after subchronic exposure to copper

Laura Fernandes de Barros Marangoni^a; Joseane Aparecida Marques^a; Gustavo Adolpho Santos Duarte^{b,c}; Cristiano Macedo Pereira^c; Emiliano Nicolas Calderon^b; Clovis Barreira e Castro^b; Adalto Bianchini^{a,d,*}

^aPrograma de Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

^bMuseu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Parque Quinta da Boa Vista, São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20940-040.

^cProjeto Coral Vivo, Associação Amigos do Museu Nacional, Parque Quinta da Boa Vista, São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20940-040.

^dInstituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália, km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

* Corresponding author: Adalto Bianchini

Universidade Federal do Rio Grande – FURG

Instituto de Ciências Biológicas – ICB

Av. Itália km 8, Campus Carreiros

96.203-900 – Rio Grande – RS – Brazil

Phone: +55 53 32935193 / FAX: +55 53 32336633

e-mail: adaltobianchini@furg.br

Abstract

Responses of biomarkers were evaluated in the Brazilian endemic coral *Mussismilia harttii* kept under control conditions or subchronically exposed to environmentally realistic copper (Cu) concentrations. Coral polyps were collected from 6 colonies at the "Recife de Fora Municipal Park" (Arraial d'Ajuda, Bahia, northeastern Brazil) and acclimated (20 days) in a Marine Mesocosm with flowing sea water continuously pumped from the coral reef area (25.5°C; salinity 35.9 ppt; pH 8.3). After acclimation, polyps were individually kept under control condition (dissolved Cu concentration: 3.0 µg/L Cu) or exposed (12 days) to increasing dissolved Cu concentrations (3.8, 5.4, and 8.6 µg/L Cu) in the Marine Mesocosm system (25.4°C; salinity 36.1 ppt; pH 8.3). Treatments were run in triplicate. After 1, 3, 5, 7, 9 and 11 days of experiment, maximum quantum efficiency (F_v/F_m) of the Photosystem II (PS-II) was measured ($n = 3$ polyps per treatment). Before (0 h) and after 4, 8, and 12 days of experiment, polyps were collected ($n = 3$ per treatment) and used for the analyses of biochemical biomarkers [ACAP: total antioxidant capacity against peroxy radicals; LPO: lipid peroxidation; DNA damage (ratio apurinic/apyrimidinic sites); and enzyme (CA: carbonic anhydrase; Ca,Mg-ATPase: Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) activity]. At the beginning of the experiment, polyps belonging to the 6 colonies were also collected (field reference corals) and used for analyses of the biochemical biomarkers. For all biochemical biomarkers, no significant difference was observed between field reference and laboratory-acclimated (control) corals, indicating the adequacy of the conditions used in the Marine Mesocosm to acclimate corals for the experiment on Cu effect on biomarkers responses. Exposure to Cu did not affect the F_v/F_m values, indicating that the photosynthetic ability of corals was

maintained under the experimental conditions tested. However, reduced ACAP and increased DNA damage were observed after exposure to environmentally relevant concentrations of dissolved Cu for 12 days, indicating that corals are facing an oxidative stress situation. Also, these organisms had the Ca,Mg-ATPase activity reduced under this experimental condition. Taken altogether, these findings suggest that subchronical exposure to environmental relevant concentrations of dissolved Cu in sea water (3.8-8.6 µg/L Cu) can affect both physiology and growth of the endemic Brazilian coral *M. harttii*. A good predictor of this deleterious situation would be the CA activity measurement, since it was significantly reduced after only 4 days of exposure to Cu, being recovered back to the control value after 12 days of exposure to the metal.

Keywords: biomarkers, calcification, copper, coral, oxidative stress, photosynthesis.

1. Introduction

Coral reefs are one of the most productive and biologically diverse ecosystems in the world, but one of the most fragile and threatened environments worldwide (Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2011). Actually, coral reefs are impacted by overexploitation and chemical pollution, as well as threatened by the excessive sedimentation and unbridled urban and industrial development in coastal zones. Recent studies indicate that approximately 65% of coral reefs worldwide are directly threatened by human activities (Downs et al., 2011; Goreau et al., 2000; Hoegh-Guldberg, 1999; Wilkinson, 1999;).

An important characteristic of coral reefs is the mutualistic interaction between corals and dinoflagellate endosymbionts *Symbiodinium* spp., the so called zooxanthellae (Bertucci, et al., 2013; Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2000). The high susceptibility of coral species to changes in environmental conditions, such as the low tolerance to variations in temperature and exposure to xenobiotics (Peters et al., 1997), can lead this organisms to a physiological stress. This condition may induce bleaching, a phenomenon characterized by loss of zooxanthellae or degradation of the photosynthetic pigments of these microalgae (Douglas, 2003; Downs et al., 2000). When completely bleached, i.e., when microalgae density is reduced by 70 to 90%, corals become whitish due to the CaCO_3 skeleton underlying the live tissue, which becomes translucent in the absence of the photosynthetic pigments of the endosymbiont (Douglas, 2003). Disruption of this symbiotic relationship can affect the photosynthetic capacity, growth and reproductive performance of corals, inducing changes in the structure of reef communities (Brown, 1997). It is important to note that the number of bleaching events has increased dramatically since the 80s (Baker et al., 2008).

Brazil has the only true coral reefs in the South Atlantic. In this case, reefs have peculiar characteristics regarding growth pattern, morphology and reef building fauna, which exhibits low diversity, high endemism and lack of scleractinian branching corals (Castro & Pires, 2001; Leão, 2002). Species of the endemic genus *Mussismilia* have an important role in the construction of Brazilian reefs (Castro & Pires, 2001; Leão, 2002). However, the coastal reefs in Brazil are currently under stress, a direct consequence of the increasing urban development, tourism, exploitation of natural resources and industrial pollution in the coastal zone (Kikuch & Leão, 2005; Leão, 2002). For example, the Abrolhos Bank, a continental shelf expansion of approximately 45,000 km² across the southern region of the Bahia state (northeastern Brazil), has shown an increased incidence of diseases affecting the endemic species *Mussismilia braziliensis* (Francini-Filho et al., 2008; Garcia et al., 2013), being forecasted a sharp decrease in coral cover for the next 50 years (Francini-Filho et al., 2008).

A significant effort has been applied to identify the effect of environmental contaminants in corals. In this case, metals are recognized as a potential stressor. In many cases, they are associated with the physiological stress and bleaching reported in corals (Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2011, 2010; Ferrier-Pagès et al., 2005; Grant et al., 2003; Houlbrèque et al., 2011; Mitchelmore et al., 2007; Nystrom et al., 2001; Reichelt-Brushett & McOrist, 2003; Rotchell & Ostrander, 2011; Sabdon, 2009; Schwarz et al., 2013; Shafir et al., 2007; Venn et al., 2009; Yost et al., 2010). Despite the fact that copper (Cu) is an essential trace metal for all living organisms, it can be toxic when at excessive concentrations in the aquatic environment (Liu et al., 2006). In invertebrates, exposure to this metal can lead to death due to its interference in metabolic functioning (Rainbow, 2002).

Copper sources include the anti-fouling paints, as well as domestic and industrial sewage, making this metal a common pollutant in the marine environments, including coral reefs (Prazeres et al., 2012). However, there are no studies concerning the effect of chemical contaminants, including Cu, on the Brazilian coral fauna.

Considering the two main aspects of the scleractinian physiology, i.e., the symbiosis between corals and zooxanthellae, and the calcification process (Bertucci et al., 2013; Bielmyer et al., 2010; Downs et al., 2000), traits associated with these aspects could be potential biomarkers to access coral fitness. According to Prazeres et al. (2012, 2011) biomarkers related to oxidative stress have excellent potential to evaluate the reef environment health. These authors showed that biomarkers such as antioxidant capacity and lipid peroxidation can be good predictors of bleaching/mortality in coral reef organisms exposed to metals. In this case, it is important to note that the symbiosis between cnidarians with symbiotic zooxanthellae is known to facilitate the occurrence of an oxidative stress situation in these invertebrates (Lesser, 2006). In the coral-symbiont association, oxygen generated by the photosynthetic microalgae is reported to diffuse within the host cells, thus increasing the possibility of oxidative damage in this cells (Rotchell & Ostrander, 2011). In corals, oxidative stress induced by temperature, UV radiation and chemical contaminants has been identified through measurements of the oxidative damage to lipids, proteins and DNA (Downs et al., 2013, 2002, 2000; Rotchell & Ostrander, 2011; Schwarz et al., 2013). These damages can even lead to cell death, depending on the intensity of the stressor and the capacity of repairing mechanisms (Rotchell & Ostrander, 2011).

Growth rate has been also reported as an effective indicator of health in coral reefs, with reduced calcification rates reflecting a decreased photosynthetic rate by zooxanthellae and/or changes in enzyme activities (Moya et al., 2008). Carbonic anhydrase (CA), a metalloenzyme that catalyzes the reversible reaction of CO₂ hydration to bicarbonate (Bertucci, et al., 2013; Moya et al. 2008), is essential for the acquisition of inorganic carbon by the holobiont, which is used by zooxanthellae in the photosynthesis and by the host in the calcification process (Bertucci et al., 2013; Furla et al., 1998). It is thus expected that environmental stressors can affect the expression of the gene encoding for this enzyme and/or the enzyme activity itself. Indeed, some studies have reported that CA inhibitors cause a decrease in calcification rate (Al-Horani et al., 2003; Bertucci et al., 2013). Therefore, CA activity seems to be a sensitive biomarker of coral exposure to metals (Bielymyer et al., 2010).

In turn, Ca²⁺-ATPase is an enzyme that transports Ca²⁺ into the calcification site while removes protons from this medium, driving the calcification reaction ($\text{Ca}^{2+} + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{CaCO}_3 + 2\text{H}^+$) towards the formation of CaCO₃ (Al-Horani et al., 2003). Ca²⁺-ATPase activity is related to the maintenance of an alkaline medium (pH > 8.2) through the operation of calcium pumps (Bertucci et al., 2013; Zoccola et al., 2004). Its function contributes to the passive diffusion of CO₂ to the calcification site, ensuring the efficiency of the process (Sandeman, 2008). Although little is known about the mechanisms involved in the calcification process in corals, it is reported that the maintenance of low intracellular Ca²⁺ concentrations preserves the cell function (Allison et al., 2011). Therefore, it is hypothesized that Ca²⁺-ATPase has a primary role in the calcification process (Al-Horani et al. 2003).

Regarding Mg^{2+} -ATPase, there are few studies focused on the role of this enzyme in the calcification process in corals. It is proposed that the control of Mg^{2+} release to the mineralizing surfaces plays a key role in the formation of coral skeletons. Therefore, it seems that the enzyme activity is used to actively control the growth of different skeletal components (Meibom et al. 2004). In fact, the Mg^{2+} -ATPase activity may be responsible for the reduction of Mg^{2+} concentration in the calcification fluid (Allison et al., 2011). According to Meibom et al. (2004), Mg^{2+} can be actively pumped through the calcicoblastic ectoderm, i.e., the aboral ectoderm in contact with the skeleton, into the mineralization surface or be available by the direct contact of sea water with the mineralization zone, as observed in foraminifers (Erez, 2003; Bentov & Erez, 2006).

Considering the lack of information on the physiology of Brazilian endemic coral species and the background described above, the use of biomarkers to assess the Cu effects on the coral *Mussismilia harttii* is appropriate and necessary. It is important to note that *M. harttii* is an extremely important species for the construction of south Atlantic reefs. Therefore, data reported in the present study on the response of a large suite of biomarkers after subchronic exposure to environmentally relevant Cu concentrations may provide a basis for prevention, rehabilitation and conservation of reefs in Brazil, which are currently subjected to both global climate change and local impacts caused by human activities.

2. Materials and Methods

2.1. Organisms collection and acclimation

Fragments of 6 colonies of the coral *M. harttii* were collected by scuba diving in the area of permanent preservation inside the "Recife de Fora Municipal Park" (Porto Seguro, BA, northeastern Brazil; (16°25'08.1"S / 38°58'54.1"W) in July 2012. Collections were performed under permission of the Brazilian Environmental Agency – IBAMA (SISBIO license # 85926584). Coral fragments were transferred to the laboratory of the "Coral Vivo Project" (Arraial d'Ajuda, Porto Seguro, Bahia, northeastern Brazil). Polyps belonging to coral fragments were individualized and fixed on ceramic plates with cyanoacrylate. They were acclimated for 20 days in a Marine Mesocosm, a permanent open experimental system that continuously renewed the exposure medium with sea water pumped directly from the coral reef environment. This system allowed us to keep the acclimation and experimental conditions (water chemistry, temperature, pH, turbidity, salinity, plankton density, photoperiod, rainfall, light incidence, etc) similar to those from the site of coral collection. Physicochemical parameters (temperature, salinity and pH) of the sea water used during the acclimation and the experimental period were measured twice a day.

2.2. Copper exposure

In the Marine Mesocosm, polyps ($n = 60$) were randomly distributed into 12 test chambers (10-L glass aquariums; 5 polyps per tank) and exposed to different copper concentrations (nominal concentration: 0, 1, 3 and 5 $\mu\text{g/L}$) for up to 12 days. A Cu stock solution (1 g/L Cu as CuCl_2) was prepared 24 h before its use to contaminate the experimental media. It was prepared in 1,000-L plastic tanks containing sea water pumped from the coral reef area. After the 1-day equilibration period, the Cu stock solution was

continuously pumped into a mixture chamber receiving sea water from the coral reef surroundings. The flux of stock solution pumped into the mixture chamber of the respective treatment was then controlled in order to achieve the desired final Cu concentration in the mixture chamber. Experimental media prepared in the mixture chambers were then continuously pumped into the test chambers at rate of 35 L/h. The renewed experimental media was then let flow through activated-charcoal filters before their final disposal into the coastal water. Every 3 days up to 12 days, non-filtered and filtered (0.45- μ m mesh filter) water samples (10 mL) were collected and acidified with 1% HNO₃ (SupraPur, Merck, USA) for analysis of the total and dissolved Cu concentration in the experimental media, respectively. Water samples were also collected at the Recife de Fora Municipal Park and the Araçáipe Beach, a coral reef area adjacent to the Marine Mesocosm (Arraial d'Ajuda, Bahia, northeastern Brazil). All water samples were desalted before Cu analysis, as described by Nadella et al. (2008). Cu concentration was determined by atomic absorption spectrophotometry coupled with a graphite furnace (Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA).

2.3. Biomarkers analyses

2.3.1. Maximum quantum efficiency of the Photosystem II (PS-II)

To evaluate the Cu effects on the maximum quantum efficiency of the PS-II, the fluorescence yielded by one polyp from each test chamber ($n = 3$ per treatment) was measured before the beginning of the experiment (0 h) and at 1, 3, 5, 7, 9, and 11 days of the experiment. The fluorescence yield is assumed as a measure of the zooxanthella fitness in

corals (dark-adapted). It was determined employing a Diving-Pam Underwater Fluorometer (Heinz Walz, Effeltrich, Germany) after at least 1 h of coral acclimation to darkness. The minimal fluorescence level (F_0) was elicited by a weak probe of modulated light, whereas the maximum fluorescence level (F_m) was detected after a saturating pulse of actinic light. Variable fluorescence (F_v) was calculated as $F_m - F_0$, and the maximum quantum efficiency of PS-II photochemistry was obtained from the F_v/F_m ratio. In dark-adapted corals, this parameter provides a convenient and reliable indication of the PS-II activity in dinoflagellates (Jones et al., 1999). A decreased ratio indicates loss in the efficiency of photochemical energy conversion and/or damage in the PS-II (Jones, 2005).

2.3.2. Biochemical biomarkers

Polyps ($n = 3$ per treatment) were collected before and after 4, 8 and 12 days after the beginning of the experiment. They were placed in 5-mL cryogenic vials and immediately frozen in liquid nitrogen for further analyses of biochemical biomarkers. At the beginning of the experiment, polyps belonging to the same 6 colonies from where biological material was obtained for the experiment were also collected and immediately stored in liquid nitrogen for further analyses of biomarkers. Data obtained from these samples (field reference) were compared to those from the control treatment (no Cu addition into the sea water) to check the adequacy of the acclimation conditions used in the Marine Mesocosm.

Sample preparation for biomarkers analyses was performed as described by Downs (2005) with some modifications. Briefly, samples were grounded in liquid nitrogen and aliquots (150-200 mg) were sonicated (Sonaer Ultrasonics, Farmingdale, NY, USA) on ice

using the specific homogenization buffer (1:2, w/v) required for analysis of each biomarker, as described below. Homogenized samples were centrifuged (13,000 g) at 4°C for 10 min. The supernatant obtained was collected and immediately used for biomarkers analyzes or kept frozen (-80°C) for no more than one week until analysis. The total protein content in the supernatant was determined using a commercial reagent kit based on the Bradford assay (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

Total antioxidant capacity against peroxy radicals (ACAP)

The ACAP assay provides useful indications on the oxyradical-mediated adverse effects under physiological conditions, since it measures the biological resistance against several kinds of oxyradicals (Regoli, 2000). ACAP was measured following the procedures described by Amado et al. (2009). The protocol employed is based on a fluorimetric (excitation: 485 nm; emission: 520 nm) method used for reactive oxygen species (ROS) detection employing 2',7' dichlorofluoresceindiacetate (H₂DCF-DA) as substrate. In turn, generation of peroxy radicals is done by termic decomposition of 2',2'- azobis (2-methylpropionamidine) dihydrochloride (ABAP). The total protein concentration in the sample homogenized was adjusted to 0.05 mg/L to obtain the best signal and measurement of fluorescence over time. Coral samples were placed in a white 96-well microplate without and with ABAP (40 mM), along with the fluorescent probe (H₂DCF-DA) at a final concentration of 16 µM. Every 5 min for up to 60 min, the resulting fluorescence in the reaction mixture was measured at 37°C using a fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

The relative difference between the ROS area in the presence and in the absence of ABAP was considered as a measurement of ACAP. Data were expressed as 1/relative area.

Lipid peroxidation (LPO)

LPO measurement was performed using the fluorimetric method described by Oakes and van der Kraak (2003), which is based on the 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). This assay quantifies the peroxidative damage to lipids through the reaction between the malondialdehyde (MDA), a product resulting from lipid peroxidation, and the thiobarbituric acid (TBA). The reaction occurs at high temperature and acidity, generating a chromogen that is measured by spectrofluorometry. Fluorescence (excitation: 515 nm; emission: 553 nm) was measured using the fluorometer (Victor 2, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA). Data were normalized considering the total protein content in the samples homogenates and expressed as nmol MDA/mg protein.

DNA damage

Apurinic/apyrimidinic (AP) sites are one of the main types of DNA lesions formed during base excision and repair of oxidized bases, deaminated or alkylated bases. Quantification of AP sites can thus be a good indicator of DNA lesions and repair induced by chemical damage. Isolation of genomic DNA samples was performed using the "DNA Isolation Kit" (PromoKine, Promocell, Heidelberg, Germany), while detection of DNA damage was done using the "DNA Damage Detection Kit" (PromoKine, Promocell, Heidelberg, Germany). In this case, an Aldehyde Reactive Probe (ARP) reagent specifically

reacts with an aldehyde group, which is the open ring form of the AP sites. After treating DNA containing AP sites with ARP reagents, AP sites were tagged with biotin residues, which can be quantified using the avidin-biotin assay followed by a colorimetric detection. AP sites were detected at 450 nm using a microplate reader (ELx-800, Biotek, Winooski, VT, EUA). Data were normalized considering the total protein content in the samples homogenates and expressed as AP sites/mg protein.

Carbonic anhydrase (CA) activity

Measurement of CA activity was performed following the method described by Henry (1991), with some modifications. This method is based on the catalytic hydration of CO₂ with the corresponding release of H⁺ and the consequent reduction in pH. Briefly, 10 µl of the sample homogenized (buffer solution composition: Tris-Base 10 mM at pH 8.5, sucrose 75 mM, PMSF 1 mM, and DTT 1 mM) were added to 2 ml of the reaction solution (Tris-Base 10 mM at pH 8.5, sucrose 75 mM, mannitol 225 mM, and phosphate 10 mM). The substrate (260 µl of distilled water saturated with CO₂) was then added to the reaction mixture and the pH was measured every 5 s for up to 30 s, using a pH meter. Blank measurements were carried out simultaneously replacing the 10 µL of sample homogenized by 10 µL of buffer solution employed for sample homogenization. A linear regression model was used to estimate the slope of the reaction. The mean slope obtained with the samples homogenized represented the catalyzed reaction ratio, while the mean slope obtained with the blank measurements represented the uncatalyzed reaction ratio. Data were normalized considering the total protein content in samples homogenates and expressed as CA Units/mg protein.

(Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase activity

Measurement of (Ca²⁺,Mg²⁺) -ATPase activity was performed using the method described by Vajreswari et al. (1983), with some modifications. Samples homogenates were prepared using a buffer solution containing Tris-HCl 100 mM (pH 7.6), sucrose 500 mM, DTT 1 mM, and PMSF 1 mM. The reaction solution used in the analysis contained NaCl 80 mM, MgCl₂ 5 mM, CaCl₂ 0.5 mM, and Tris-HCl 20 mM (pH 7.6) and incubation was carried out in 30 °C. Inorganic phosphate (Pi) released by the enzyme activity in the reaction medium was measured using the commercial reagent kit "Fosfato" (Dole, Goiânia, Goiás, Brazil), which is based on the colorimetric method described by Fisk and Subbarow (1925). Measurements were performed at 630 nm using the microplate reader (ELx-800, Biotek, Winooski, VT, EUA). Data were normalized considering the total protein content in the samples homogenates and expressed as mM Pi/mg protein/min.

2.4. Data presentation and analysis

Data were expressed as mean ± standard error of the mean (SE). Data for field reference and laboratory-acclimated corals were compared using the Student's *t* test. The Fv/Fm data were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) for repeated measures, followed by the Fisher test. In turn, time of exposure and Cu effects on the response of biochemical biomarkers analyzed were tested using the two-way ANOVA for non-repeated measures, followed by a Fisher multiple comparison test. In both cases, ANOVA assumptions (data normality and homogeneity of variances) were previously

verified and data were *log*-transformed when necessary. In all cases, significance level adopted was 95% ($\alpha = 0.05$).

3. Results

3.1. Physicochemical parameters of the sea water

Mean values of the physicochemical parameters of the sea water employed were similar for the acclimation and Cu exposure periods. Temperature, salinity and pH over the acclimation period of corals to the Marine Mesocosm corresponded to $25.5 \pm 0.02^{\circ}\text{C}$, 35.9 ± 0.20 ppt, and 8.3 ± 0.00 , respectively. During the experimental period, mean values were $25.4 \pm 0.11^{\circ}\text{C}$, 36.1 ± 0.20 ppt, and 8.3 ± 0.00 , respectively. Mean total and dissolved Cu concentrations in the sea water samples from the "Recife de Fora Municipal Park" and the coral reef area adjacent to the Marine Mesocosm corresponded to 3.1 ± 0.7 $\mu\text{g/L}$ Cu and 1.8 ± 0.3 $\mu\text{g/L}$ Cu. In turn, mean total Cu concentrations in the experimental media were 4.6 ± 1.3 , 6.3 ± 1.0 , 7.7 ± 0.5 , and 10.7 ± 1.1 $\mu\text{g/L}$ Cu, for the nominal values of 0 (control), 1, 3, and 5 $\mu\text{g/L}$ Cu, respectively. Mean dissolved Cu concentrations in the experimental media corresponded to 3.0 ± 0.7 , 3.8 ± 0.8 , 5.4 ± 0.9 , and 8.6 ± 0.3 $\mu\text{g/L}$ Cu, respectively.

3.2 Biomarkers responses

For all biochemical biomarkers analyzed, no significant difference was observed between mean values for the field reference and the laboratory-acclimated corals (Table 1).

Maximum quantum efficiency (F_v/F_m) of PS-II varied over time in all treatments. Despite no significant effect of Cu on the F_v/F_m was observed at the different experimental

times. When data for Cu-exposed corals were grouped, mean values of F_v/F_m corresponded to 0.984 ± 0.005 , 0.976 ± 0.006 , 0.979 ± 0.006 , 0.969 ± 0.006 , 0.967 ± 0.006 , and 0.975 ± 0.008 after 1, 3, 5, 7, 9, and 11 days of experiment, respectively (Fig. 1).

After 12 days of exposure to Cu, corals exposed to $3.8 \mu\text{g/L}$ Cu showed higher ACAP than those exposed to the same Cu concentration for a shorter period of time. Also, these corals showed significant higher ACAP than those exposed to 5.4 and $8.6 \mu\text{g/L}$ Cu for the same period of time (12 days) (Fig. 2).

LPO increased significantly after 12 days of experiment in all treatments. However, no significant effect of Cu on LPO was observed at each exposure time (Fig. 3).

In all treatments, no significant change was observed in the number of AP sites (DNA damage) over the experimental time. In corals exposed to Cu for 12 days, DNA damage was greater with increasing copper concentration in experimental media, being significantly higher in corals exposed to $5.4 \mu\text{g.L}^{-1}$ Cu. However, we could not detect significant differences between corals kept under control conditions ($3.0 \mu\text{g.L}^{-1}$ Cu) and those exposed to $8.6 \mu\text{g.L}^{-1}$ Cu for 12 days (Fig. 4).

A reduced CA activity was observed in corals kept under control conditions after 12 days of experiment. Also, corals exposed to any Cu treatment showed this reduced enzyme activity. However, they also had a reduced CA activity after 4 days of experiment, which was not seen in control corals. Therefore, a significant decrease in CA activity was observed in corals exposed to 5.4 and $8.6 \mu\text{g/L}$ Cu respect to those kept under control conditions ($3.0 \mu\text{g/L}$ Cu) for 4 days. After 8 days of experiment, CA activity was still significantly lower in corals exposed to $5.4 \mu\text{g/L}$ Cu respect to those kept under control conditions (Fig. 5).

Control corals showed an increased $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity after 12 days of experiment. Also, corals exposed to 3.8 $\mu\text{g/L}$ Cu for 12 days showed a higher enzyme activity than those exposed to the same Cu concentration for 4 days. On the other hand, corals exposed to 8.6 $\mu\text{g/L}$ Cu for 12 days showed a lower $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity than those exposed to the same Cu concentration for 4 days. After 4 days of experiment, enzyme activity was lower in corals exposed to 3.8 $\mu\text{g/L}$ Cu than in those exposed to 8.6 $\mu\text{g/L}$ Cu. After 12 days of exposure, $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity was reduced in corals exposed to all Cu treatments when compared to those kept under control conditions (Fig. 6).

4. Discussion

Copper is known to induce oxidative stress in many organisms, including corals (Schwars et al. 2013). In the present study, the coral *M. harttii* exposed to 3.8 $\mu\text{g/L}$ of dissolved Cu for 12 d showed a significant increased antioxidant capacity, possibly as a way to counteract the stress caused by exposure to this metal. In the other hand, the higher concentrations of dissolved Cu (5.4 and 8.6 $\mu\text{g/L}$) tested seemed to inhibit antioxidant defenses. Therefore, the coral *M. harttii* showed a reduced ACAP response after being subchronically exposed to environmentally relevant concentrations of dissolved Cu. The response of this biomarker was dependent on the dissolved Cu concentration ranging from 3.8 to 8.6 $\mu\text{g/L}$ in sea water. Also, an increased number of AP sites was observed after 12 days of exposure to the concentration of 5.4 $\mu\text{g/L}$ of dissolved Cu tested. This response was also dependent on the concentration of dissolved Cu in the sea water ranging from 3.0 to 5.4 $\mu\text{g/L}$ Cu. Despite no significant Cu effect on LPO was detected, these findings suggest that

corals are facing an oxidative stress condition induced by Cu exposure. This statement is based on the fact that a decreased antioxidant capacity and an increased oxidative damage to DNA was observed in the coral *M. harttii* as a consequence of the prolonged exposure to Cu concentrations tested, which are likely to occur in coastal areas. It is important to note that the Cu effects described above were observed at dissolved Cu concentrations similar to the maximum allowed by Brazilian regulations for sea water (5.0 µg/L dissolved Cu; CONAMA, 2005).

Our results described above are in complete agreement with those previously reported for other cnidarians. For example, Anjos et al. (2013) showed that Cu is toxic to cells of the sea anemone *Bunodossoma cangicum* exposed to 7.8 µg/L Cu. They observed that this low Cu concentration activated the cellular defense mechanisms. However, the response was not sufficient to effectively prevent an increased ROS generation and genetic damage. Furthermore, they observed that a higher Cu concentration (15.6 µg/L) inhibited the response of such mechanisms. In the coral *M. harttii*, we observed a reduced ACAP that suggests an increased ROS production, which was paralleled by an increased level of DNA damage even at a lower concentration of Cu than that tested by Anjos et al. (2013). In the coral *M. franksi*, Yost et al. (2010) demonstrated an effect of Cu at concentrations of 5, 10 and 50 µg/L on the antioxidant dimethylsulfoniopropionate (DMSP), an agent that contributes to the inherent antioxidant system present in zooxanthellae. All these findings are clear evidences that Cu exposure even at low concentrations can induce oxidative stress in cnidarians, including DNA damage in corals.

If not repaired, DNA damage can lead to apoptosis, which is considered an extreme condition in the range of cellular responses of corals to oxidative stress (Lesser, 2004; 2006). It is important to note that corals exposed to the higher concentration of dissolved Cu tested (8.6 µg/L) in the present study showed a similar level of DNA damage to those kept under control conditions for 12 days. This finding suggests that the DNA repairing mechanism was possibly triggered at the higher dissolved Cu concentration tested (8.6 µg/L) to avoid an excessive damage to the genetic material. It is important to note that this concentration is almost half of that inhibiting the response of the defense and repairing mechanisms in the sea anemone *B. cangicum* (Anjos et al., 2013). In a recent study, Schwarz et al. (2013) also demonstrated an increasing pattern in DNA damage with increasing Cu concentrations (<1-30 µg/L). This response was paralleled by an upregulation in the expression of several genes encoding for enzymatic antioxidant agents, probably as a response to an increased ROS production in the coral *Montastraea franksi* exposed to Cu. Also, Venn et al. (2009) have provided important insights on corals defenses against chemical pollutants. These authors reported an increased expression of the genes encoding for the multi-xenobiotic resistance protein (P-gp) and the heat shock proteins (Hsp 70/Hsp 90), an evidence of the upregulation of gene expression in response to short-term exposure (4 and 8 h) to high Cu concentrations (30 and 100 µg/L Cu).

A recent study by Main et al. (2010) provided evidence on the importance of the symbiotic relationship in cnidarians dealing with Cu stress. Toxicity tests were conducted using the sea anemone *Aiptasia pallida*, with and without its zooxanthellae symbiont. The presence of the symbiont seemed advantageous at lower Cu concentrations, but the symbiotic

anemones were more sensitive at higher levels of the metal. The production of antioxidant enzymes (superoxide dismutase and catalase) appeared to be greatly hindered by the absence of the symbiont. On the other hand, zooxanthellae may have produced excessive amounts of ROS in sea anemones exposed to higher Cu concentrations, which could damage the host and potentially disrupt the symbiosis. Our results are similar to those described above, since evidences of oxidative stress were observed in corals exposed to Cu (lower ACAP and higher DNA damage). Also, neither evidence of algae expulsion (bleaching) nor reduction in the maximum quantum efficiency of the PS-II was observed. In a previous study, Grant et al. (2003) also reported no expulsion of algae or a decrease in the photosynthetic capacity in the coral *Plesiastrea versipora* exposed to higher concentrations of Cu (up to 12-fold the background level) for 12-36 days. Nystrom et al. (2001) also did not find a significant change in the photosynthetic rate in the coral *Porites cylindrica* exposed to Cu (11 µg/L) for 24 h. However, as observed in the present study, early signs of damage from oxidative stress were detected by measures of fluorescent compounds (tryptophan and coral fluorophores) in the coral *P. versipora*, suggesting that Cu may induce damage to these compounds in the coral host before causing damages to the intracellular algae (Grant et al., 2003). Furthermore, our results are also in agreement with those reported by Bielmyer et al. (2010). These authors reported no significant alterations in the PS-II efficiency in *Acropora cervicornis* and *Montastraea faveolata* zooxanthellae after exposure to Cu (5 weeks) at concentrations up to 10 µg/L. On the other hand, they showed a decreased PS-II efficiency in *Pocillopora damicornis* zooxanthellae exposed to 4 µg/L Cu, showing that sensitivity to Cu may vary

according to the organism's physiology. This could be related to the distinct *Symbiodinium* and Cu bioaccumulation patterns presented by the three coral species (Bielmyer et al. 2010).

The effect of metals on PS-II efficiency have been widely investigated (e.g., Geiken et al., 1998; Bielmyer et al., 2010). Copper is known to substitute the central Mg^{2+} in the chlorophyll molecule, and may lower the fluorescence quantum yield (Kupper et al., 1996). According to Giardi et al. (2001), higher concentrations of heavy metals are strictly inhibiting, but at low concentrations they can stimulate the photochemical activities of the PS-II. Although the PS-II complex is sensitive to various pollutants, including heavy metals, its susceptibility to these chemicals is highly variable (Giardi et al., 2001). It has been also postulated that, during short term exposure of plants to heavy metals, the Calvin cycle reactions are more likely to be the primary target of toxic influence than the PS-II (Krupa et al., 1993). This could be yet another possible explanation for the results found in the present study.

Scleractinian corals are known to be one of the major calcifying groups of organisms, contributing with around 15% of the global calcium carbonate production (Tambutté et al., 2011, 1996). The observed effect of Cu on the activity of enzymes associated with the calcification process in corals suggests that exposure to environmentally relevant concentrations of the metal could be decreasing the coral growth rate. In fact, exposure of the coral *M. harttii* to low dissolved Cu concentrations (5.4 or 8.6 $\mu g/L$) caused an acute and temporary reduction in the CA activity, which was recovered by a compensatory response over the prolonged exposure (12 days) to the metal. Bielmyer et al. (2010) also reported a decreased CA activity after exposure to increased concentrations of Cu (10 and 20 $\mu g/L$) for

35 days in *A. cervicornis* and *M. faveolata*. This response was paralleled by an increased accumulation of Cu in the tissue. It is also important to note that CA activity showed a strong correlation with the organism's growth rate. In the symbiotic sea anemones *Stichodactyla helianthus* and *Condylacts gigantea*, it was also shown a decreased CA activity due to exposure to metals [Cu, nickel (Ni) and lead (Pb)] at concentrations ranging from 10 to 40 µg/L for 48 h, without any evidence of zooxanthellae expulsion (Gilbert & Guzmán, 2001).

Considering that no significant effect on the photosynthetic efficiency was observed and that CA activity was reduced after exposure of the coral *M. harttii* to low concentrations of dissolved Cu, we hypothesize that this metal can interfere in the amount of substrate available for using in the calcification process by the host. In light of these findings and as suggested in the previous studies mentioned above, we point the CA activity as an interesting and potential tool to access corals fitness before irreversible damages could occur. In fact, the activity of this enzyme has been shown to be a good indicator of both acute and chronic impacts in calcifying organisms.

The literature concerning the effects of heavy metals on the (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase in corals biomineralization process is limited. Calcium uptake in corals tissue is crucial for the skeleton formation. Calcium is transported through the calicoblastic epithelium to the site of calcification by an energy-requiring mechanism, the Ca²⁺-ATPase (Tambutté et al., 1996). Also, magnesium seems to be an important element in the formation of coral skeletons, regarding the growth of different skeletal components (Meibom et al. 2004). In the present study, the (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase activity showed to be very sensitive after exposure of the coral *M. harttii* to Cu concentrations as low as 3.8 µg/L for 12 days. Tambutté et al. (1996)

tested different inhibitors of the transport mechanisms involved in the calcification process, and a significant reduction in Ca^{2+} deposition was observed in the coral *Stylophora pistillata* exposed to heavy metals [cadmium (Cd) and Ni]. On the other hand, there are only a few studies regarding the Mg^{2+} -ATPase activity in corals. For example, its activity ($\sim 1.7 \mu\text{mol Pi/mg protein/min}$) was detected in a microsomal fraction extracted from the hermatypic coral *Galaxea fascicularis* (Ip & Lim, 1991). However, there are no reports on the possible effect of heavy metals on the Mg^{2+} -ATPase activity in corals.

It is important to stress that the holobiont may be adversely affected by contaminants, and the uptake of potentially toxic metals, such as Cu, can metabolically substitute essential elements. Corals exposed to metals may concentrate these contaminants in their skeletal organic matrices, which can possibly inhibit or prevent skeletal deposition (Howard & Brown, 1984). Thus, chronic exposure to low Cu concentrations can interfere in $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in corals, affecting both Ca^{2+} and Mg^{2+} transport. In light of the findings reported in the present study together with those reported in the literature, we suggest that the observed effect of Cu on the $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})$ -ATPase activity in the coral *M. harttii* may result in decreased calcification rates and local imperfections in the crystal structure of the coral skeleton after a prolonged exposure to the metal.

Finally, it is interesting to note that most experiments on coral ecotoxicology are performed with minimal replication, and with organisms being kept in closed systems with infrequent water changes (Kline et al., 2006). In this context, mesocosms are important tools to generate valuable information about the many complex ecological interactions, to examine global change effects, and to verify impacts of human disturbance in coral reefs (Luckett et

al. 1996). In fact, these open systems enable more realistic ecological experimentation by incorporating much more ecological complexity, impossible to be achieved in conventional laboratory systems (Kangas & Adey, 1996). Data reported in the present study clearly demonstrate a Cu toxicity in the Brazilian scleractinian coral *M. harttii* through a more realistic ecological experimentation. Furthermore, using a Marine Mesocosm we were able to show that this effect can occur

likely greater susceptibility of *M. harttii* to bleaching and decreased growth rate when exposed to Cu, a feature that turns the coral more vulnerable to pathogens and adverse environmental conditions.

5. Conclusions

Potential threats to coral reefs in Brazil and worldwide are obvious. Therefore, it is imperative to understand the physiological responses of corals to chemical pollutants for developing efficient conservation strategies. It was shown in the present study that Cu exposure has a potential to reduce the coral resilience capacity, and consequently the resilience of the whole reef ecosystem. This is an alarming situation in the context of an era of climate changes and ocean acidification, since combined effects of chemical pollutants, increasing ocean temperature and acidification are likely to impact more severely the coral reefs and indirectly those who depend on these ecosystems. It is also worth to note that, in agreement with Prazeres et al. (2011), biomarkers associated with oxidative stress (ACAP and DNA damage) and with the calcification process [CA and $(\text{Ca}^{2+}, \text{Mg}^{2+})\text{-ATPase}$] are good

tools to access the coral reefs health and good predictors of coral susceptibility to bleaching and mortality.

6. Acknowledgments

Financial support is acknowledged to the International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil). Support for field research is acknowledged to the Coral Vivo Project and its sponsors Petrobras, through the Petrobras Environmental Program, and Arraial d'Ajuda Eco Parque. A. Bianchini is a researcher fellow from the Brazilian CNPq (Proc. # 304430/2009-9) supported by the International Canada Research Chair Program from IDRC. C.B. Castro is a researcher fellow from the Brazilian CNPq (Proc. #303970/2010-3). L.F.B. Marangoni was a graduate fellow from CAPES.

7. References

Al-Horani, F.A.; Al-Moghrabi, S.M.; 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.

- Allison, N.; Cohen, I.; Finch, A.A.; Erez, J.; EMIF. 2011. Controls on Sr/Ca and Mg/Ca in scleractinian corals: The effects of Ca-ATPase and transcellular Ca channels on skeletal chemistry. *Geochim. Cosmochim. Ac.* 75, 6350-6360.
- Amado, L. L.; Garcia, M. L.; Ramos, P. B.; Freitas, R. F.; Zafalon, B.; Ferreira, J. L. R.; Yunes, J. S.; Monserrat, J. M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins toxicity. *Science. Total. Environ.* 407, 2115–2123.
- Anjos, V.A.; da Silva-Júnior, F.M.R.; Souza, M.M. 2013. Cell damage induced by copper: na explant model to study anemone cells. *Toxicol. in Vitro*. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2013.11.013>
- Baker, A.C.; Glynn, P.W.; Riegl, B. 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuar. Coast. Shelf S.* 80, 435-471.
- Bentov, S.; Erez, J. 2006. Impact of biomineralization processes on the Mg content of foraminiferal shells: A biological perspective. *Geochem. Geophys. Geosyst.* 7, Q01P08, DOI: 10.1029/2005GC001015.
- Bertucci, A.; Moya, A.; Tambutté, S.; Allemand, D.; Supuran, C.T.; Zoccola, D. 2013. Carbonic anhydrases in anthozoan corals – A review. *Bioorg. Med. Chem.* 21, 1437-1450.
- Bielmyer, G.K.; Gosell, M.; Bhagooli, R.; Baker, A.C.; Langdon, C.; Gillette, P.; Capo, T.R. 2010. Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium* spp.). *Aquat. Toxicol.* 97, 125-133.

- Brown, B.E. 1997. Coral Bleaching: causes and consequences. *Coral Reefs*. 16, 129-138.
- Castro CB, Pires DO, 2001. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bull Mar Sci* 69: 357-371.
- CONAMA. 2005. Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução N° 357, de 17 de março de 2005. Brasília, Brasil.
- Douglas, A.E., 2003. Coral bleaching — how and why? *Mar. Pollut. Bull.* 46, 385–392.
- Downs, C. 2005. Cellular diagnostics and its application to aquatic and marine toxicology. In: Ostrander, G.K. (ed.), *Techniques in Aquatic Toxicology Vol.2*. CRC press. United States of America. pp. 181-208.
- Downs, C.A.; Fauth, J.E.; Downs, V.D.; Ostrander, G.K. 2010. In vitro cell-toxicity screening as an alternative animal model for coral toxicology: effects of heat stress, sulfide, rotenone, cyanide, and cuprous oxide on cell viability and mitochondrial function. *Ecotoxicology*. 19, 171-184.
- Downs, C.A.; Fauth, J.E.; Halas, J.C.; Dustan, P.; Bemiss, J.; Woodley, C.M. 2002. Oxidative stress and seasonal coral bleaching. *Free Rad. Biol. Med.* 33, 533-543.
- Downs, C.A.; McDougall, K.E.; Woodley, C.M.; Fauth, J.E.; Richmond, R.H.; Kushmaro, A.; Gibb, S.W.; Loya, Y.; Ostrander, G.K.; Kramarsky-Winter, E. 2013. Heat-Stress and Light-Stress induce Different Cellular Pathologies in the Symbiotic Dinoflagellate during Coral Bleaching. *PLoS One*. 8, e77173.
- Downs, C.A.; Mueller, E.; Phillips, S.; Fauth, J.E.; Woodley, C.M. 2000. A Molecular Biomarker System for Assessing the Health of Coral (*Montastrea faveolata*) During Heat Stress. *Mar. Biotechnol.* 2, 533-544.

- Downs, C.A.; Woodley, C.M.; Fauth, J.E.; Knutson, S.; Burtscher, M.M.; May, L.A.; Avadanei, A.R.; Higgins, J.L.; Ostrander, G.K. 2011. A survey of environmental pollutants and cellular-stress markers of *Porites astreoides* at six sites in St. John, US. Virgin Islands. *Ecotoxicology*. 20, 1914-1931.
- Erez, J. 2003. The source of ions for biomineralization in foraminifera and their implications for paleoceanographic proxies. *Rev. Mineral. Geochem.* 54, 115- 149.
- Ferrier-Pagès, C.; Houlbrèque, F.; Wyse, E.; Richard, C.; Allemand, D.; Boisson, F. 2005. Bioaccumulation of zinc in the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*. 24, 636-645.
- Fiske, C. H.; Subbarow, Y. 1925. The Calorimetric Determination of Phosphorus. *J Biol Chem.* LXVI (2), 375-400.
- Francini-Filho, R.B.; Moura, R.L.; Thompson, F.L.; Reis, R.M.; Kaufman, L.; Kikuchi, R.K.P.; Leão, Z.M.A.N. 2008. Diseases leading to accelerated decline of reef corals in the largest South Atlantic reef complex (Abrolhos Bank, eastern Brazil). *Mar. Pollut. Bull.* 56, 1008-1014.
- Furla, P.; Tambutté, S.B.; Jaubert, J.; Allemand, D. 1998. Diffusional permeability of dissolved inorganic carbon through the isolated oral epithelial layers of the sea anemone, *Anemonia viridis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 221, 71-88.
- Garcia, G.D.; Gregoracci, G.B.; Santos, E.O.; Meirelles, P.M.; Silva, G.G.Z.; Edwards, R.; Sawabe, T.; Gotoh, K.; Nakamura, S.; Iida, T.; de Moura, R.L.; Thompson, F.L. 2013. Metagenomic Analysis of Healthy and White Plague-Affected *Mussismilia braziliensis* Corals. *Microb. Ecol.* 65, 1076-1086.

- Geiken, B.; Masojídek, M.; Rizzuto, M.L.; Pompili, M.L.; Giardi, M.T. 1998. Incorporation of [^{35}S]methionine in higher plants reveals that stimulation of the D1 reaction centre II protein turnover accompanies tolerance to heavy metal stress. *Plant. Cell. Environ.* 21, 1265-1273.
- Giardi, M.T.; Koblízek, M.; Masojídek, J. 2001. Photosystem II-based for the detection of pollutants. *Biosens. Bioelectron.* 16, 1027-1033.
- Gilbert, A.L.; Guzmán, H.M. 2001. Bioindication Potencial of Carbonic Anhydrase Activity in Anemones and Corals. *Mar. Pollut. Bull.* 42, 742-744.
- Goreau, T.J., McClanahan, T., Hayes, R., Strong, A.E., 2000. Conservation of coral reefs after the 1998 global bleaching event. *Conserv. Biol.* 14, 5–15.
- Grant, A.J.; Graham, K.; Frankland, S.; Hinde, R. 2003. Effect of copper on algal-host interactions in the symbiotic coral *Plesiastrea versipora*. *Plant. Physiol. Biochem.* 41, 383-390.
- Henry, R.P. 1991. Techniques for measuring carbonic anhydrase activity in vitro: the electrometric delta pH and pH stat methods. In: Dodgson S.J.; Tashian, R.E.; Gros, G.; Carters, N.D. (eds.), *The carbonic anhydrases: cellular physiology and molecular genetics*. Plenum. New York. pp 119-125.
- Hoegh-Guldberg, O., 1999. Climate change, coral bleaching and the future of the world's coral reefs. *Mar. Fresh. Res.* 50, 839–866.
- Houlbrèque, F.; Rodolfo-Metalpa, R.; Jefree, R.; Oberhansli, F.; Teyssié, J.-L.; Boisson, F.; Al-Trabeen, K.; Ferrier-Pagès, C. 2011. Effects of increased $p\text{CO}_2$ on zinc

- uptake and calcification in the tropical coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*. 31, 101-109.
- Howard, L.S. & Brown, B. E. 1984. Heavy metals and reef corals. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 22, 195-210.
- Ip, Y.K.; Lim, A.L.L. 1991. Are calcium and strontium transported by the same mechanism in the hermatypic coral *Galaxea fascicularis*? *J.exp. Biol.* 159. 507-513.
- Jones, R. 2005. The ecotoxicological effects of Photosystem II herbicides on corals. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 495–506.
- Jones, R.J.; Kildea, T.; Hoegh - Guldberg, O. (1999) PAM chlorophyll fluorometry: a new in situ technique for stress assessment in scleractinian corals, used to examine the effects of cyanide from cyanide ®shing. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 864-874.
- Kangas, P.; Adey, W. 1996. Mesocosms and ecological engineering. *Ecol. Eng.* 6, 1-5.
- Kline, D.I.; Bryant, J.; Kisflaudy, E.; Rohwer, G.; Nostropaur, F.; Grayson, J., Knowlton, N.; Rohwer, F. 2006. The aquatic automated dosing and maintenance system (AADAMS). *Limnol. Oceanogr. Methods.* 4, 184-192.
- Krupa, Z., Oquist, G., Huner, N. P. A. 1993. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* – a fluorescence analysis. *Physiol. Plantarum.* 88, 626-630.
- Kupper, H.; Kupper, F.; Spiller, M. 1996. Environmental relevance of heavy metal-substituted chlorophylls using the example of water plants. *J. Exp. Bot.* 47, 259- 266.
- Leão, Z.M.A.N., 2002. Abrolhos, BA - O complexo recifal mais extenso do Atlântico Sul. In: Schobbenhaus, C., Campos, D.A., Queiroz, E.T., Winge, M., Berbert- Born, M.L.C. (Eds.), *Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil*. DNPM/CPRM -

- Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), Brasília, Brasil, pp. 345–359.
- Leão, Z.M.A.N.; Kikuchi, R.K.P. 2005. A relic coral fauna threatened by global changes and human activities, Eastern Brasil. *Mar. Pollut. Bull.* 51, 599-611.
- Lesser, M.P. 2004. Experimental coral reef biology. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 300, 217- 252.
- Lesser, M.P. 2006. Oxidative Stress in Marine Environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.* 68, 253-278.
- Liu, H.; Wang, W.; Zhand, J.; Wang, X. 2006. Effects of copper and its ethylenediaminetetraacetate complex on the antioxidant defenses of the goldfish, *Crassius auratus*. *Ecotox. Environ. Safe.* 65, 350-354.
- Luckett, C.; Adey, W.H.; Morrissey, J.; Spoon, D.M. 1996. Coral reef mesocosms and microcosms – successes, problems, and the future of laboratory models. *Ecol. Eng.* 6, 57-72.
- Main, W.P.L.; Ross, C.; Bielmyer, G.K. 2010. Copper accumulation and oxidative stress in the sea anemone, *Aiptasia pallida*, after waterborne copper exposure. *Comp. Biochem. Physiol.* 151, 216-221.
- Meibom, A.; Cuif, J.P.; Hillion, F.; Constantz, B.R.; Juillet-Leclerc, A.; Dauphin, Y.; Dunbar, R.B. 2004. Distribution of magnesium in coral skeleton. *Geophys. Res. Lett.* 31, L23306. DOI: 10.1029/2004GL021313
- Mitchelmore, C.L.; Verde, E.A.; Weis, V.M. 2007. Uptake and partitioning of copper and cadmium in the coral *Pocillopora damicornis*. *Aquat. Toxicol.* 85, 48-56.

- Moya, A.; Tambutté, S.; Bertucci, A.; Tambutté, E.; Lotto, S.; Vullo, D.; Supuran, C.T.; Allemand, D.; Zoccola, D. 2008. Carbonic Anhydrase in the Scleractinian Coral *Stylophora pistillata*: characterization, localization, and role in biomineralization. *J. Biol. Chem.* 283, 25475-25484.
- Nadella, S. D.; 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.* 149, 340–348.
- Nystrom, M.; Nordemar, I.; Tedengren, M. 2001. Simultaneous and sequential stress from increased temperature and copper on the metabolism of the hermatypic coral *Porites cylindrical*. *Mar. Biol.* 138, 1225-1231.
- Oakes, K. D.; Kraak, G. J. V. D. 2003. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. *Aquat. Toxicol.* 63, 447–463
- Peters, E.C.; Gassman, N.J.; Firman, J.C.; Richmond, R.H.; Power, E.A. 1997. Ecotoxicology of tropical marine ecosystems. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 12- 40.
- Prazeres, M. F.; Martins, S.E.; Bianchini, A. 2012. Assessment of water quality in coral communities from Fernando de Noronha, Brazil: Biomarkers analysis in *Amphistegina lessonii*. *J. Foramin. Res.* 42, 56-65.
- Prazeres, M.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.

- Rainbow, P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what?. *Environ. Pollut.* 120, 497-507.
- Regoli, F. 2000. Total oxyradical scavenging capacity (TOSC) in polluted and translocated mussels: a predictive biomarker of oxidative stress. *Aquat. Toxicol.* 50, 351–361.
- Reichelt-Brushett, A.J.; McOrist, G. 2003. Trace metals in the living and nonliving components of scleractinian corals. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1573-1582.
- Rotchell, J.M.; Ostrander, G.K. 2011. Molecular toxicology of corals: a review. *J. Toxicol. Environ. Health, Part B: Crit. Rev.* 14, 571–592.
- Sabdono, A. 2009. Heavy Metal Levels and Their Potential Toxic Effect on Coral *Galaxea fascicularis* from Java Sea, Indonesia. *Res. J. Environ. Sci.* 3, 96-102.
- Sandeman, I.M. 2008. Light driven lipid peroxidation of coral membranes and a suggested role in calcification. *Rev. Biol. Trop.* 56, 1-9.
- Schwarz, J.A.; Mitchelmore, C.L.; Jones, R.; O’Dea, A.; Seymour, S. 2013. Exposure to copper induces oxidative and stress responses and DNA damage in the coral *Montastraea franksi*. *Comp. Biochem. Physiol.* 157, 272-279.
- Shafir, S., Van Rijn, J., and Rinkevich, B. 2007. Short and long term toxicity of crude oil and oil dispersants to two representative coral species. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5571–74.
- Tambutté, É.; Allemand, D.; Mueller, E.; Jaubert, J. 1996. A compartmental approach to the mechanism of calcification in hermatypic corals. *J. Exp. Biol.* 199, 1029-1041.

- Tambutté, S.; Holcomb, M.; Ferrier-Pages, C.; Reynaud, S.; Tambuté, E.; Zoccola, D.; Allemand, D. 2011. Coral biomineralization: From the gene to the environment. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 408, 58-78.
- Vajreswari A, Srinivasa Rao P, Kaplay SS, Tulpule PG, 1983. Erythrocyte membrane in rats fed high uric acid-containing mustard oil: osmotic fragility, lipid composition, an (Na^+ , K^+) – and (Ca^{2+} , Mg^{2+}) – ATPases. *Bioch Med* 29:74-84.
- Venn, A.A.; Quinn, J.; Jones, R.; Bodnar, A. 2009. P-glycoprotein (multi-xenobiotic resistance) and heat shock protein gene expression in the reef coral *Montastraea franksi* in response to environmental toxicants. *Aquat. Toxicol.* 93, 188-195.
- Wilkinson, C.R., 1999. Global and local threats to coral reef functioning and existence: review and predictions. *Mar. Fresh. Res.* 50, 867–878.
- Yost, D.M.; Jones, R.J.; Mitchelmore, C.L. 2010. Alterations in dimethylsulfoniopropionate (DMSP) levels in the coral *Montastraea franksi* in response to copper exposure. *Aquat. Toxicol.* 98, 367-373.
- Zoccola D., Tambutte E., Kulhanek E., Puverel S., Scimeca J. C., Allemand D.; Tambutte S. 2004. Molecular cloning and localization of a PMCA P-type calcium ATPase from the coral *Stylophora pistillata*. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembranes.* 1663, 117–126.

Table 1. Biomarkers in field reference (FR) and laboratory-acclimated (LA) corals (*Mussismilia harttii*). Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 6). No significant difference was observed between mean values for each biomarker. ACAP: total antioxidant capacity against peroxyl radicals (1/relative area); LPO: lipid peroxidation (nmol MDA/mg protein); CA: carbonic anhydrase (enzyme units/mg protein); Ca,Mg-ATPase: (Ca²⁺,Mg²⁺)-ATPase (mM Pi/mg protein/min).

Biomarker	FR coral	LA coral
ACAP	0.007 $\pm$ 0.002	0.008 $\pm$ 0.001
LPO	233 $\pm$ 25	232 $\pm$ 22
CA activity	269 $\pm$ 19	266 $\pm$ 32
Ca,Mg-ATPase activity	2.83 $\pm$ 0.44	2.64 $\pm$ 0.33

Legend to Figures

Figure 1. Maximum quantum yield (F_v/F_m) of the Photosystem II over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved Cu in natural sea water. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). Different capital letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among times of exposure for the same Cu concentration. No significant difference was observed among the mean values for the different Cu concentrations for the same time of exposure.

Figure 2. Total antioxidant capacity against peroxyl radicals (ACAP) over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved Cu in natural sea water. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). Different capital letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among times of exposure for the same Cu concentration. Different lowercase letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among Cu concentrations for the same time of exposure.

Figure 3. Lipid peroxidation (LPO) levels over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved copper in natural sea water. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). Different capital letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among times of exposure for the same Cu concentration. No significant difference was observed among the mean values for the different Cu concentrations for the same time of exposure.

Figure 4. DNA damage over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved copper in natural sea water. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). No significant difference was observed among the mean values for different times of exposure for the same Cu concentration. Different lowercase letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among Cu concentrations for the same time of exposure.

Figure 5. Carbonic anhydrase (CA) activity over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved copper in natural sea water. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). Different capital letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among times of exposure for the same Cu concentration. Different lowercase letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among Cu concentrations for the same time of exposure.

Figure 6. (Ca^{2+} , Mg^{+2})-ATPase activity over the experimental time in the coral *Mussismilia harttii* exposed to four different concentrations of dissolved copper. Data are expressed as mean $\pm$ SE (n = 3). Different capital letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among times of exposure for the same Cu concentration. Different lowercase letters indicate significant different mean values ($p < 0.05$) among Cu concentrations for the same time of exposure.

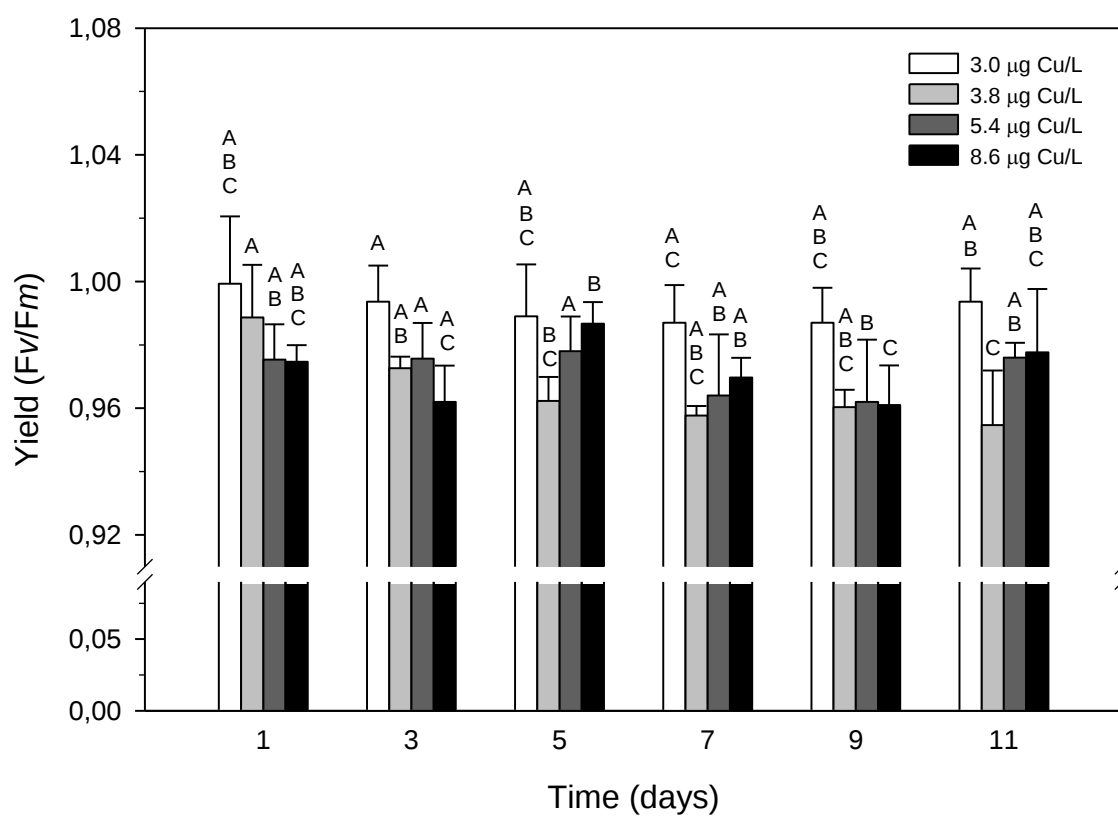
Figure 1

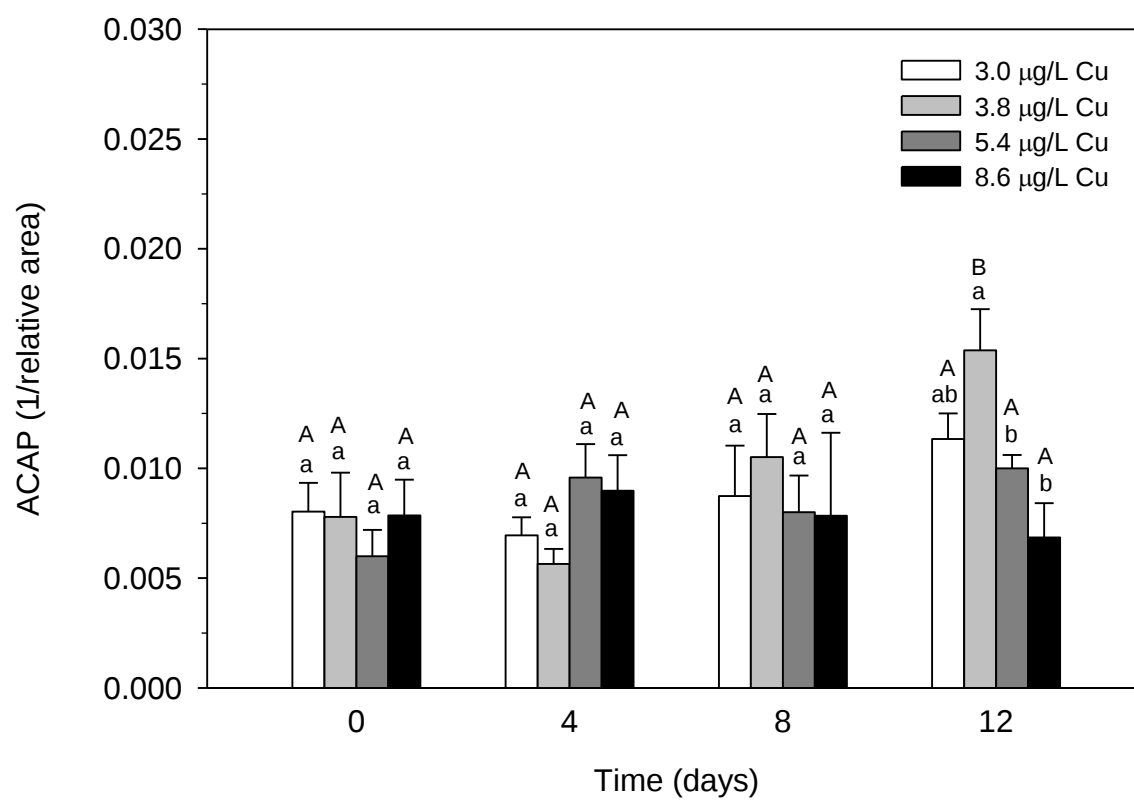
Figure 2

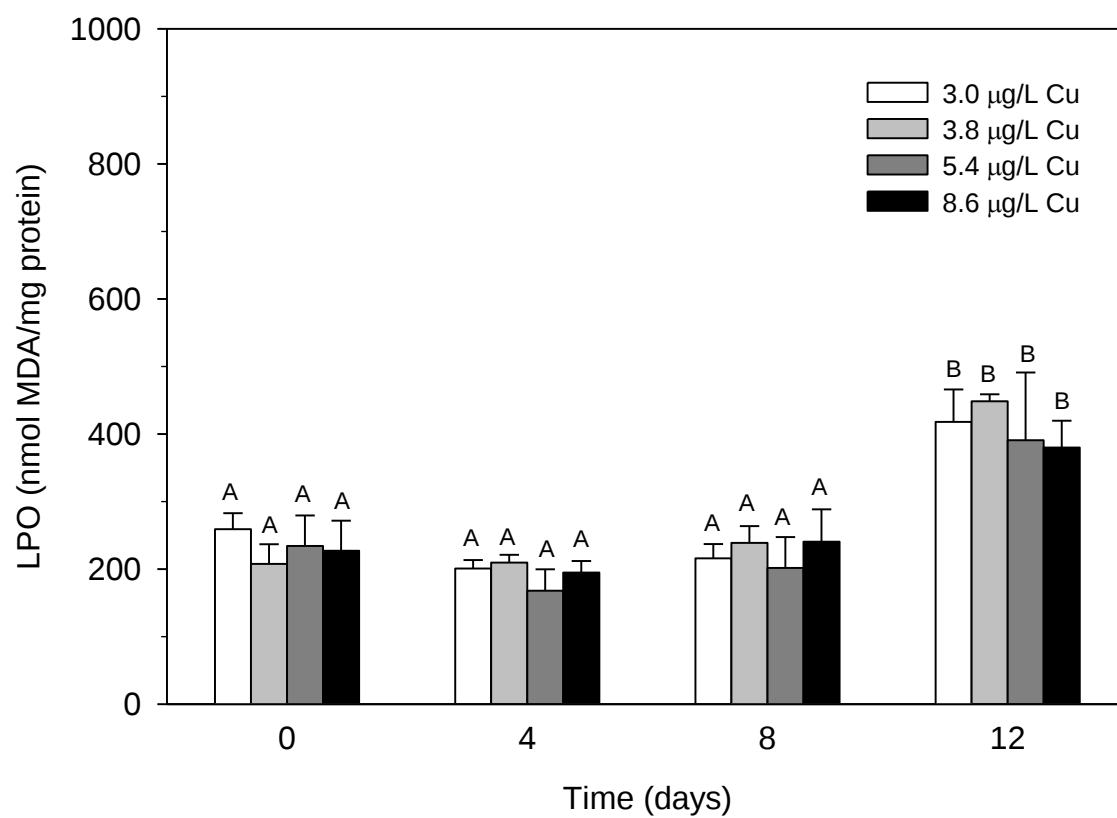
Figure 3

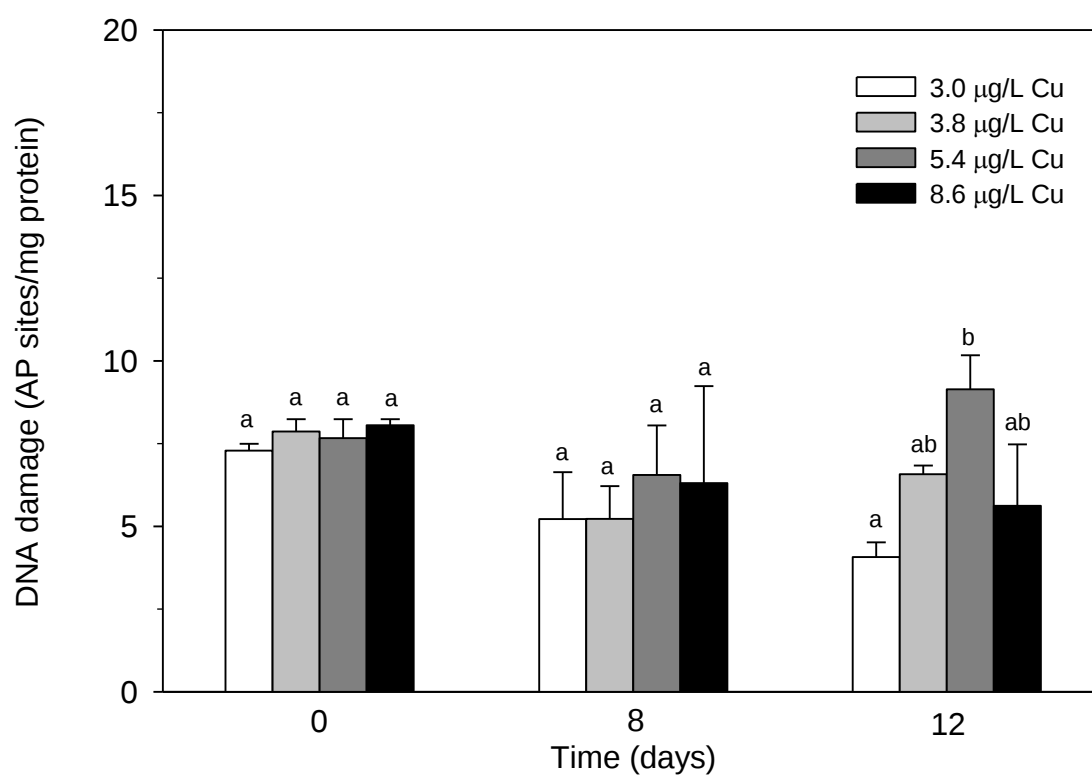
Figure 4

Figure 5

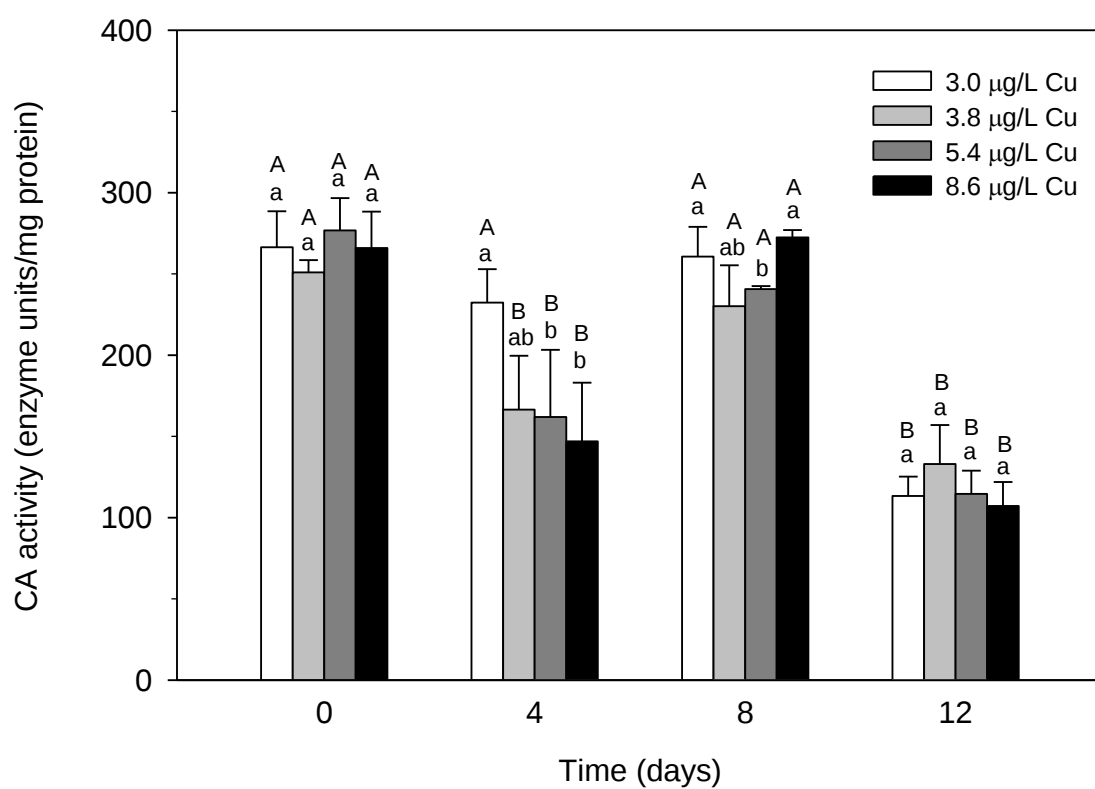


Figure 6

