

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

ACIDIFICAÇÃO MARINHA E METABOLISMO
ENERGÉTICO NO HIDROCORAL *Millepora*
alcicornis (CNIDARIA: HYDROZOA)

ANDREA CARLINA JESULICH

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
Setembro de 2016

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Betty Rojas e Miguel Jesulich, por sempre me darem seu apoio e amor, ainda quando às vezes eu não compreendia seu jeito de me amar. Era só aceitar, sem entender intrincados motivos. Só amar. E amar é difícil. Sempre é mais difícil.

Agradeço aos meus amigos por serem meu lar dentro e fora de Brasil. A vida não teria motivos sem amigos. Todos juntos são quase um deus, pois estão em todas as partes, são onipresentes. Agradeço a meus meios amigos, meus bons amigos, meus muitos bons amigos, a meus amigos próximos, a meus amigos ideais, a meus melhores amigos e a meus não-amigos (De Souza e Hutz, 2008).

E com essa prévia, chego, através deste texto, a meu orientador, o Prof. Adalberto Bianchini, uma pessoa de caráter alegre e líder ideal. Ele me ofereceu sua orientação desde a primeira vez que abri a porta de seu escritório. Ainda com a minha ausência, me deu sua mão para afiançar e me tranquilizar.

Agradeço a todos os integrantes do Grupo de Pesquisa coordenado pelo Prof. Bianchini por me receberem. Pela troca de experiências e saberes. Agradeço em especial a Mariana Lauer, a Joseane Marques, a Laura Marangoni e a Juliana Fonseca, por me introduzirem no mundo da bioquímica e ao ambiente de laboratório. Agradeço ao Gustavo “Baila” e Ileana Ortega, por fazerem mais leve minha frustração com a bioestatística. Todos vocês ajudaram-me a aclimatar.

Agradeço especialmente à Organização dos Estados Americanos (OEA), por me haver selecionada como bolsista do programa PAEC-OEA-GCUB 2013 e à FURG e ao Instituto de Ciências Biológicas (ICB), por me receberem e por toda a infraestrutura oferecida. Agradeço aos técnicos e demais trabalhadores do ICB, sempre com um sorriso e palavras de superação.

Agradeço ao Projeto Coral Vivo e a todos seus integrantes que permitiram, com muita dedicação e esforço, a realização experimental deste trabalho.

A todos vocês, muito obrigada!!!

ÍNDICE

RESUMO.....	6
1. INTRODUÇÃO	7
2.1. Objetivo geral	21
2.2. Objetivo específico	21
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1. Local de amostragem.....	22
3.2. Coleta, aclimação e exposição dos hidrocorais à acidificação	22
3.3. Análise das atividades enzimáticas.....	26
4.1. Condições experimentais.....	30
4.2. Atividades enzimáticas	30
7. ANEXO.....	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições físico-químicas mantidas no mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo durante a realização do presente estudo. Os dados são expressos como média \pm intervalo de confiança de 95% (Sarmiento et al., 2015).	31
---	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Respiração celular: a) Glicólise aeróbica, b) Glicólise anaeróbica, c) Ciclo de Krebs. As enzimas chaves analisadas no presente estudo estão destacadas em vermelho. 18
- Figura 2.** Cadeia transportadora de elétrons. Fonte: Nelson & Cox, 2008. 19
- Figura 3.** Linha de costa brasileira mostrando o Estado da Bahia (a), o distrito de Arraial d' Ajuda em Porto Seguro (b) e o Parque Municipal Marinho Recife de Fora (c). 23
- Figura 4.** Desenho experimental utilizado no presente estudo. O esquema apresenta a disposição dos hidrocorais nos cochos do mesocosmo marinho durante o período de aclimação e exposição a três níveis de redução de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 24
- Figura 5.** Monitoramento do pH da água do mar nos cochos do mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo durante o período de realização do presente estudo (Sarmiento *et al.*, 2015). 31
- Figura 6.** Atividade da hexoquinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 4). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 32
- Figura 7.** Atividade da fosfofrutoquinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 4). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 33

Figura 8. Atividade da piruvato quinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 4). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 34

Figura 9. Atividade da lactato desidrogenase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 4). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 35

Figura 10. Atividade da citrato sintase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão (n = 4). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($P < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. 36

RESUMO

A acidificação marinha associada à absorção das emissões excessivas de CO₂ na atmosfera causadas pelas atividades humanas pode provocar acidose intracelular, induzindo assim eventos de branqueamento e, portanto, comprometendo o metabolismo energético em hidrocorais. O hidrocoral *Millepora alcicornis* Linnaeus, 1758 pertence a um grupo de corais considerados dentre os mais conspícuos, sendo, depois dos corais escleractíneos, os mais importantes construtores de recifes nos mares tropicais. Apesar dessa importância, suas respostas fisiológicas frente à acidificação marinha não são conhecidas. No presente estudo foram avaliados os possíveis efeitos da redução do pH da água do mar na atividade de enzimas-chave do metabolismo energético em *M. alcicornis*. Fragmentos do hidrocoral foram coletados no Parque Municipal Marinho do Recife de Fora (Porto Seguro, Bahia). Após 20 dias de aclimação em mesocosmo, os hidrocorais foram expostos a diferentes níveis de redução do pH da água do mar, correspondendo 0,3; 0,6 e 0,9 unidades de pH em relação àquele observado naturalmente na água do mar do local de coleta dos hidrocorais (controle; pH 8,1). Após 16 e 30 dias de exposição, os hidrocorais foram coletados e analisados quanto às atividades da hexoquinase, fosfofrutoquinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase e citrato sintase. Os resultados mostraram que, em todos os tratamentos de pH, não foram observadas variações significativas na atividade das enzimas analisadas, indicando que o hidrocoral *M. alcicornis* é capaz de manter constante a atividade das principais vias metabólicas envolvidas na produção de energia sob condições de acidificação da água do mar (pH > 7,2) a médio prazo.

1. INTRODUÇÃO

Os oceanos são considerados o segundo reservatório de carbono na Terra, depois da atmosfera (Pereira dos Santos & Marcondes, 1990), absorvendo anualmente cerca de 2% da produção de dióxido de carbono (CO₂) antropogênico (Kinsey & Hopley, 1991). Estima-se que entre os anos 2000 e 2008, aproximadamente 26% da produção de CO₂ antropogênico foi absorvida pelos oceanos e 29% pela biosfera terrestre, sendo que os 45% restantes permaneceram na atmosfera (Le Quéré *et al.*, 2009). A absorção do CO₂ pelos oceanos ocorre quando a pressão parcial de CO₂ (pCO₂) atmosférico é maior do que a pCO₂ na superfície da água do mar. Nesse caso, o CO₂ difunde-se para a água do mar na interface ar-água (Sabine *et al.*, 2004). O aumento das emissões de CO₂ pela queima de combustíveis fósseis após o início da Era Industrial e aos desmatamentos para uso agrícola da terra causou um aumento drástico na concentração de CO₂ na atmosfera, que era de 277 partes por milhão (ppm) na Era Pré-industrial (IPCC, 2014) e passou a ser atualmente de 397,08 ppm (NOAA, 2015).

O CO₂ absorvido pela superfície oceânica reage com a molécula de água (H₂O) e forma o ácido carbônico (H₂CO₃), um ácido fraco, o qual se dissocia rapidamente liberando prótons (H⁺), bicarbonato (HCO₃⁻) e carbonato (CO₃²⁻), conforme a seguinte reação: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \leftrightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{CO}_3^{2-} + 2\text{H}^+$ (Zeebe, 2011). Por sua vez, o CO₂ dissolvido na água do mar também reage diretamente com o CO₃²⁻, formando assim mais HCO₃⁻, de acordo com a seguinte reação: $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_3^{2-} \leftrightarrow 2\text{HCO}_3^-$ (Doney *et al.*, 2009; Gattuso & Hansson, 2011). A concentração de H⁺ é proporcional à razão $[\text{HCO}_3^-]/[\text{CO}_3^{2-}]$. Quando esta razão aumenta, devido à absorção de CO₂ pela água do mar, ocorre uma redução no pH da água do mar, processo conhecido como “acidificação marinha” (Gattuso & Hansson, 2011). Cabe ressaltar que o pH é uma

medida de acidez que expressa, em escala logarítmica, a concentração de H^+ . Portanto, um decréscimo de 0,1 unidade no pH representa um aumento de quase 30% na concentração de H^+ (Sabine *et al.*, 2004). No pico do último período glacial, o pH das águas marinhas superficiais era 8,3. Pouco antes da Era Industrial, o mesmo correspondia a 8,18, sendo que atualmente ele passou a ser 8,10 (Gattuso, 2015). Assim, projeta-se uma diminuição adicional entre 0,30 e 0,46 unidades de pH até o ano 2100 (Bhadury, 2015) e de 0,8 até 2300 (Caldeira & Wickett, 2005).

Em condições típicas de pH da água do mar, os níveis de CO_3^{2-} encontram-se em quantidade suficiente para que estruturas calcárias sejam facilmente secretadas pelos organismos calcificadores (Marangoni *et al.*, 2016a). Em caso de acidificação marinha, a diminuição na concentração de CO_3^{2-} levaria a um decréscimo do estado de saturação do $CaCO_3$, bem como da intensidade de sua saturação na água do mar (Gattuso & Hansson, 2011), promovendo assim a dissolução das estruturas calcárias (Weeber *et al.*, 2015). Entre 1766 e 2007, o estado de saturação do $CaCO_3$ diminuiu quase 20%. Até 2100, estima-se que ainda ocorra uma redução potencial de aproximadamente 40% nesta condição (Gattuso & Hansson, 2011).

Para a aragonita, uma das formas de $CaCO_3$ precipitada por corais formadores de recifes para a construção de seus esqueletos (Bertucci *et al.*, 2013), o cenário de alteração no estado de saturação é bem mais alarmante do que aquele preconizado para outras formas de $CaCO_3$, tal como a calcita. De fato, a aragonita possui uma estrutura termodinamicamente menos estável, fazendo com que a mesma seja quase 50% mais solúvel do que a calcita e, portanto, mais vulnerável aos efeitos negativos da acidificação marinha (Bhadury, 2015).

Os recifes de corais estão entre os ecossistemas mais diversos, complexos e produtivos do planeta e, por isso, são também uns dos mais vulneráveis à sobreexploração (Birkeland, 1997). Os estoques permanentes de peixes presentes nos recifes de corais incentivam o desenvolvimento da economia pesqueira (Birkeland, 1997), principalmente aquela de natureza artesanal. De fato, esta gera uma receita superior a 5,7 bilhões de dólares por ano, fornecendo bens e serviços para 6 milhões de pescadores distribuídos em cerca de 100 países (Cesar *et al.*, 2003; Teh *et al.*, 2013). Além disso, existe um ganho econômico resultante das atividades de recreação e turismo de mergulho que se realiza nos recifes de corais (Pendleton, 1995), as quais fornecem emprego para mais de 350.000 pessoas (Dixon *et al.*, 1993).

Do ponto de vista ecológico, os recifes de corais têm a função de abastecer as praias com areia carbonática, bem como dissipar a energia hidrodinâmica das correntes, ondas e tempestades. Dessa forma, eles protegem grandes áreas da linha de costa tropical contra os efeitos da erosão, promovendo a formação de lagunas e ambientes sedimentares favoráveis ao crescimento de algas e ecossistemas de mangues (Moberg & Folke, 1999; Oliveira *et al.*, 2008). Os recifes de corais também funcionam como importantes zonas de reprodução (desova e berçário) e de alimentação para muitos organismos (Moberg & Folke, 1999). Eles têm também um papel altamente importante nos processos biogeoquímicos, atuando como fixadores de nitrogênio e sumidouros de CO₂ (Gattuso *et al.*, 1996). Atuam ainda como depuradores do ambiente marinho, pois transformam, desintoxicam e sequestram resíduos de origem antrópica. Por exemplo, hidrocarbonetos são transformados em CO₂ e H₂O pela microbiota que habita nos corais (Peterson e Lubchenco, 1997). Neste contexto, estudos recentes têm relatado a importância do cultivo de corais para a produção de produtos bioativos para o

tratamento de diversos transtornos e doenças humanas. A geração destes produtos está intimamente associada à microbiota coralina (Leal *et al.*, 2013).

Infelizmente, em muitas partes do mundo, a saúde dos recifes de corais está sendo ameaçada por processos naturais e/ou por ações antropogênicas, como a poluição local (Mostofa *et al.*, 2016), a sedimentação excessiva e o desenvolvimento urbano e industrial nas zonas costeiras. Estimativas em nível global relatam que 33-50% das áreas de recifes de corais já teriam sido destruídas e que as remanescentes se encontram ameaçadas de perda nas próximas duas décadas (ISRS, 2015).

A maioria dos recifes coralíneos apresenta forma de vida colonial, que pode chegar a ser composta por milhares de pólipos, isto é, indivíduos geneticamente idênticos (Marangoni *et al.*, 2016a). A capacidade de alguns corais de construir recifes em oceanos tropicais oligotróficos é explicada, principalmente, por sua associação mutualística com um grupo excepcionalmente diverso de dinoflagelados endossimbiontes do gênero *Symbiodinium*, também denominados zooxantelas (Bertucci *et al.*, 2013). Os endossimbiontes se encontram em vacúolos localizados na endoderme dos corais, os quais são chamados de simbiossomas (Davy *et al.*, 2012). Os principais benefícios desta relação simbiótica são nutricionais, pois os dinoflagelados, além de determinar a cor dos corais (Davy *et al.*, 2012), eles realizam fotossíntese e transferem ao hospedeiro o carbono fixado através da fotossíntese (fotossintatos) na forma de glicerol, glicose, aminoácidos e lipídeos (Yellowlees *et al.*, 2008). Adicionalmente, os dinoflagelados proveem o coral com o O₂ produzido durante a fotossíntese, contribuindo desta forma em até 90% da energia requerida pelo coral para crescimento e reprodução (Gierz *et al.*, 2016). Em troca, o coral oferece refúgio e contribui com o metabolismo do endossimbionte ao fornecer nutrientes essenciais como nitrogênio,

fósforo e enxofre, os quais são produzidos através de processos catabólicos ou absorvidos do ambiente (Furla *et al.*, 2005; Gierz *et al.*, 2016). Estudos moleculares demonstram que estas associações são mais flexíveis do que se pensava, mostrando diferentes graus de especificidade (Baker, 2003). De fato, o hospedeiro é capaz de controlar ou interromper a associação na presença de estresse ambiental, podendo até culminar em episódios de branqueamento dos corais (Yellowlees *et al.*, 2008; Marangoni *et al.*, 2016a).

O fenômeno de branqueamento se refere à perda da cor do coral, exibindo assim o seu esqueleto calcário branco (Leão *et al.*, 2008). Este processo é resultado de uma disfunção fotossintética (Dove & Hoegh-Guldberg, 2006), degradação do pigmento fotossintético das zooxantelas e/ou posterior liberação do endossimbionte do coral hospedeiro (Leão *et al.*, 2008; Gibbin *et al.*, 2014). Estima-se que, quando a densidade das zooxantelas atinge uma redução de 70 a 90%, os corais tornam-se totalmente branqueados (Douglas, 2003). No entanto, os mesmos podem se recuperar do branqueamento, dependendo da intensidade e duração do estresse ambiental (Bielmyer *et al.*, 2010). O branqueamento é uma das principais causas do atual declínio dos recifes de corais, sendo que esse fenômeno é atribuído, principalmente, ao incremento da temperatura (Glynn *et al.*, 2001; Lewis, 2006) e à acidificação marinha (Kaniewska *et al.*, 2012; Kaniewska *et al.*, 2015).

Nos últimos 30 anos, os hidrocorais da família Milleporidae têm sofrido degradação e/ou declínio de suas populações em eventos naturais e/ou por atividades humanas. Cabe salientar que estes corais são considerados um dos grupos de organismos formadores de esqueletos calcários mais conspícuos. Além disso, são considerados como sendo os segundos maiores construtores de recifes nos mares

tropicais, ficando apenas atrás dos corais pétreos da ordem Scleractinia (Lewis, 2006). Williams & Bunkley-William (1990) relataram que o incremento global da temperatura a partir de 1980 ocasionou uma serie de ciclos de branqueamento de corais ao redor do mundo, estando estes ciclos intimamente relacionados à Oscilação Sul-El Niño (OSEN). Entre 1986-1988 ocorreu o evento mais severo, sendo reportado o branqueamento e mortalidade de mileporas em Belize, Ilhas Caimã, Cuba, México, Porto Rico, Columbia, Florida e Ilhas Virgens. Na Venezuela, 50 a 60% das colônias de mileporas sofreram branqueamento. Dentre estas se encontravam colônias de *Millepora alcicornis*, as quais foram totalmente branqueadas, bem como colônias de *M. complanata*, as quais foram parcialmente afetadas. Por sua vez, em Taiwan e Ilhas Maldívias foi observado branqueamento severo em colônias de *M. platiphyla*. Entre 1997 e 1998, Glynn *et al.* (2001) contabilizaram um grande número de colônias branqueadas de hidrocorais e corais escleractíneos no Panamá e Equador, bem como descreveram a possível extinção de *M. bochmai* no Golfo de Chiriqui no Panamá. Por sua vez, Loya *et al.* (2001) relataram a possível extinção de três espécies de *Millepora* no Japão. Na região Nordeste do Brasil, Leão *et al.* (2008) observaram o branqueamento em colônias de *M. alcicornis*, *M. nitida* e *M. braziliensis* entre os meses de fevereiro e abril de 1998 a 2005. Neste caso, das 10511 colônias contadas, apenas 1273 foram afetadas por branqueamento (12%), sendo que os percentuais de colônias afetadas variaram entre 3 e 79%.

A família Milleporidae possui apenas um gênero vivo, o gênero *Millepora*, o qual pertence à classe Hydrozoa e ao Filo Cnidaria. Esse gênero compreende um grupo de hidrozoários polipóides coloniais que secretam esqueleto calcário (Amaral *et al.*, 2002). Estes hidrocorais podem apresentar diversas formas, tais como a ramificada,

foliar, arborescente, arredondada irregular, hemisférica e colunar ou uma mistura destas formas (Amaral *et al.*, 2008). Os corais mileporas apresentam uma coloração amarelada ou amarronzada e têm sido descritos como sendo um grupo com uma alta plasticidade fenotípica, a qual varia temporalmente com as mudanças nas condições ambientais, tais como intensidade da ação da onda, turbulência da água e luminosidade. Conseqüentemente, durante décadas, é um dos grupos alvos de debates por diversos taxonomistas (Lewis, 2006; Amaral *et al.*, 2008; Ruiz-Ramos *et al.*, 2014). Diferentemente dos corais escleractíneos (classe Anthozoa), as mileporas apresentam pólipos polimórficos ou zooides, com diferentes funções, tais como alimentação, reprodução e defesa (Amaral *et al.*, 2002). Além disso, as mileporas apresentam reprodução sexuada, envolvendo alternância de gerações e formação de uma medusa pelágica, forma esta que não está presente em nenhum organismo da classe Anthozoa (Brusca & Brusca, 2007). Alimentam-se de zooplâncton, através de gastrozooides que se sobressaem dos poros do esqueleto (Lewis, 1992; Lewis, 2006), bem como dos produtos da atividade fotossintética de *Symbiodinium sp.* (Lewis, 2006; Amaral *et al.*, 2008).

Os hidrocorais apresentam organelas globulares urticantes utilizadas para a defesa e a captura de presas, chamadas nematocistos (García-Arredondo *et al.*, 2012). Estas organelas contêm difenilamina (Al-Lihaibi *et al.*, 2002), um veneno com efeitos mais severos que os compostos produzidos por outros cnidários. Este veneno pode agir como uma substância hemolítica, necrosante, antigênica, podendo ser até mesmo letal (Ibarra-Alvarado *et al.*, 2007). Quando entram em contato com a pele humana, os hidrocorais ocasionam queimaduras, eritemas e/ou pústulas (García-Arredondo *et al.*,

2012). Por isso, os corais mileporas são comumente denominados como “corais de fogo” ou “corais urticantes” (Al-Lihaibi *et al.*, 2002).

O gênero *Millepora* possui 18 espécies reconhecidas, as quais estão distribuídas nos mares tropicais de todo o mundo (Boschma, 1948). Oito espécies ocorrem no oceano Índico, nove no Pacífico Oeste e Central, quatro no Pacífico Leste e sete no Atlântico Oeste (Boschma, 1948; Cairns *et al.*, 1999; Amaral *et al.*, 2008). No Brasil, foram reportadas quatro espécies: *M. alcicornis* Linnaeus, 1758, *M. brasiliensis* Verrill, 1868, *M. nítida* Verrill, 1868 e *M. laboreli*, sendo que as últimas três espécies são consideradas endêmicas (Amaral *et al.*, 2008). No Brasil, as mileporas ocorrem em extensas colônias de até 2 m de diâmetro, especialmente na região Nordeste (Amaral *et al.*, 2008). Elas são consideradas como sendo um dos principais responsáveis pela complexidade tridimensional dos recifes do Brasil, pois são os únicos corais ramificados presentes nessa região (Leão *et al.*, 2003; Oliveira *et al.*, 2008). Portanto, elas cumprem o papel funcional exercido pelos corais escleractíneos nos recifes do Caribe e Indo-Pacífico (Pereira *et al.*, 2012; Nunes, 2013).

O hidrocoral *M. alcicornis*, espécie alvo do presente estudo, possui uma distribuição que ultrapassa as fronteiras caribenhas e se estende desde as Ilhas Bermudas (Atlântico Norte) até o estado do Rio de Janeiro (Brasil). Podem também ser observadas no oceano Atlântico Oriental, com ocorrência em Cabo Verde e nas Ilhas Canárias (Amaral *et al.*, 2008; Obura *et al.*, 2008; Clemente *et al.*, 2011), no oeste da África. *M. alcicornis* é considerada uma espécie fotófila, que se localiza tipicamente na parte superior, bordas e laterais das formações coralinas (Ponce, 2009). Seu crescimento ocorre na forma de agrupamentos de colônias comumente ramificadas ou, mais raramente, incrustadas sobre organismos sésseis e outros substratos rígidos do recife

(Amaral *et al.*, 1997; Ruiz-Ramos *et al.*, 2014). As colônias podem ter altura superior a um metro (Amaral *et al.*, 2008) e atingir mais de um metro de diâmetro, formando sequências que cobrem grandes áreas do topo recifal (Brito *et al.*, 2010), geralmente entre profundidades de 0 a 50 m (Amaral *et al.*, 1997). Em relação a sua reprodução, a liberação de medusas foi registrada durante a estação chuvosa, entre junho a agosto, na região nordeste do Brasil (Amaral *et al.*, 1997).

Lewis (2006) destaca que as respostas fisiológicas e ecológicas das espécies de mileporas a uma ampla variedade de perturbações naturais e antropogênicas são semelhantes às das espécies de corais escleractíneos. Nesse contexto, cabe ressaltar que a regulação do pH intracelular é um elemento central da fisiologia dos corais (Venn, 2014), sendo crucial para a manutenção da homeostase, atividade metabólica celular (Gibbin *et al.*, 2014) e manutenção da simbiose coral-alga (Laurent *et al.*, 2013). Estudos sobre a biomineralização em corais escleractíneos demonstram que esses organismos podem regular positivamente o pH de seus fluídos de calcificação em relação ao pH da água do mar circundante (Venn, 2014). Essa regulação é feita especificamente em nível do meio de calcificação extracelular (MCE) ou no sítio de calcificação, localizado entre a calicoderme e o esqueleto do coral, espaço que se acredita ser semifechado e onde ocorre a precipitação do esqueleto de CaCO_3 (Wooldridge, 2013, Marangoni *et al.*, 2016a).

Como descrito acima, num cenário de acidificação marinha, a diminuição da concentração de CO_3^{2-} em relação às outras espécies de carbono inorgânico afetaria negativamente o estado de saturação do CaCO_3 e a taxa de calcificação pelos corais (Gattuso & Hansson, 2011; Delgadillo-Nuño *et al.*, 2014). O incremento de H^+ na coluna de água e, portanto, da água do mar na cavidade gastrovascular do pólipos

(Gibbin *et al.*, 2014; Holcomb *et al.*, 2014), implicaria em um aumento do custo energético ou em alterações na alocação de energia, principalmente para a manutenção do equilíbrio ácido-base do coral (Edmunds & Wall, 2014; Kaniewska *et al.*, 2015). Por exemplo, um aumento da síntese de transportadores iônicos de membrana (Kaniewska *et al.*, 2012; Vidal-Dupiol *et al.*, 2013), provocaria uma diminuição da quantidade de energia disponível para outros processos biológicos como reprodução, recrutamento, assentamento larval, crescimento, fotossíntese, respiração, calcificação (Gattuso & Hansson, 2011; Edmunds, 2012; Vidal-Dupiol *et al.*, 2013), entre outros.

A energia necessária aos processos biológicos mencionados acima é adquirida através de processos catabólicos e anabólicos, os quais constituem o metabolismo energético. Neste contexto, uma das vias catabólicas mais importantes é a respiração celular, tanto aeróbica quanto anaeróbica (Hill *et al.*, 2012). A respiração aeróbica ocorre através de três vias distintas: a glicólise, o ciclo de Krebs ou ciclo do ácido tricarboxílico e a fosforilação oxidativa ou cadeia transportadora de elétrons (Hill *et al.*, 2012). Essas vias são reguladas por enzimas-chave ou marca-passo, as quais catalisam reações irreversíveis. As atividades destas enzimas são altamente reguladas, fazendo assim com que as mesmas atuem como controladoras da velocidade do catabolismo (Nelson & Cox, 2008). De fato, estudos têm avaliado a presença de enzimas-chave do metabolismo energético em corais (Gattuso *et al.*, 1993; Manchenko *et al.*, 1993; Lesser *et al.*, 1994; Wooldridge, 2013; Rivest & Hofman, 2014; Murphy & Richmond, 2016).

Por sua vez, a glicólise é um processo onde ocorre a conversão de uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato, com a produção de duas moléculas de ATP e duas moléculas de nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzido (NADH). Esse processo se dá através de dez reações químicas sequenciais catalisadas

enzimaticamente. Neste contexto, destacam-se a hexoquinase, fosfofrutoquinase e piruvato quinase, enzimas responsáveis pelo controle da velocidade catabólica da via glicolítica (Fig. 1a) (Berg *et al.*, 2002).

O piruvato produzido pela glicólise é convertido pelo complexo da piruvato desidrogenase em acetil-CoA, o qual entra no ciclo de Krebs e, juntamente com o oxaloacetato, é oxidado ao longo da via, produzindo CO₂ e H₂O. A energia dessa oxidação é armazenada na forma das coenzimas reduzidas NADH e flavina adenina dinucleotídeo reduzida (FADH₂) (Hill *et al.*, 2012). Em condições anaeróbicas, o NADH produzido na via glicolítica não pode ser oxidado pelo oxigênio e, portanto, não promove a formação da nicotinamida adenina dinucleotídeo oxidado (NAD⁺). Neste caso, a célula ficaria sem receptor de elétrons e, portanto, incapaz de continuar a via catabólica. Assim, um processo alternativo importante é a oxidação do NADH pela redução do piruvato a lactato, a qual ocorre através da reação catalisada pela lactato desidrogenase (Fig. 1b) (Randall *et al.*, 2000).

Por sua vez, o ciclo de Krebs ocorre em oito etapas catalisadas enzimaticamente, onde os intermediários podem prover outros pontos do metabolismo ou serem desviados para a síntese de outras moléculas. A regulação do ciclo ocorre pela citrato sintase, a isocitrato desidrogenase e a α -cetoglutarato desidrogenase. Nesta etapa, são produzidas duas moléculas de ATP, oito de NADH e duas de FADH₂ (Fig. 1c) (Nelson & Cox, 2008). As coenzimas reduzidas, NADH e FADH₂, fornecem prótons e elétrons para os complexos da cadeia transportadora de elétrons (Fig. 2), os quais bombeiam prótons para o espaço intermembrana da mitocôndria, gerando assim gradiente de H⁺ (Nelson & Cox, 2008). Por sua vez, essa gradiente gera um potencial eletroquímico entre as membranas mitocondriais, que é utilizado pela ATP-sintase, uma enzima localizada na

membrana interna da mitocôndria, para a produção líquida de 38 moléculas de ATP. Por sua vez, as moléculas de ATP formadas são facilmente utilizadas pelos organismos para a manutenção e crescimento celular (Wooldridge, 2013).

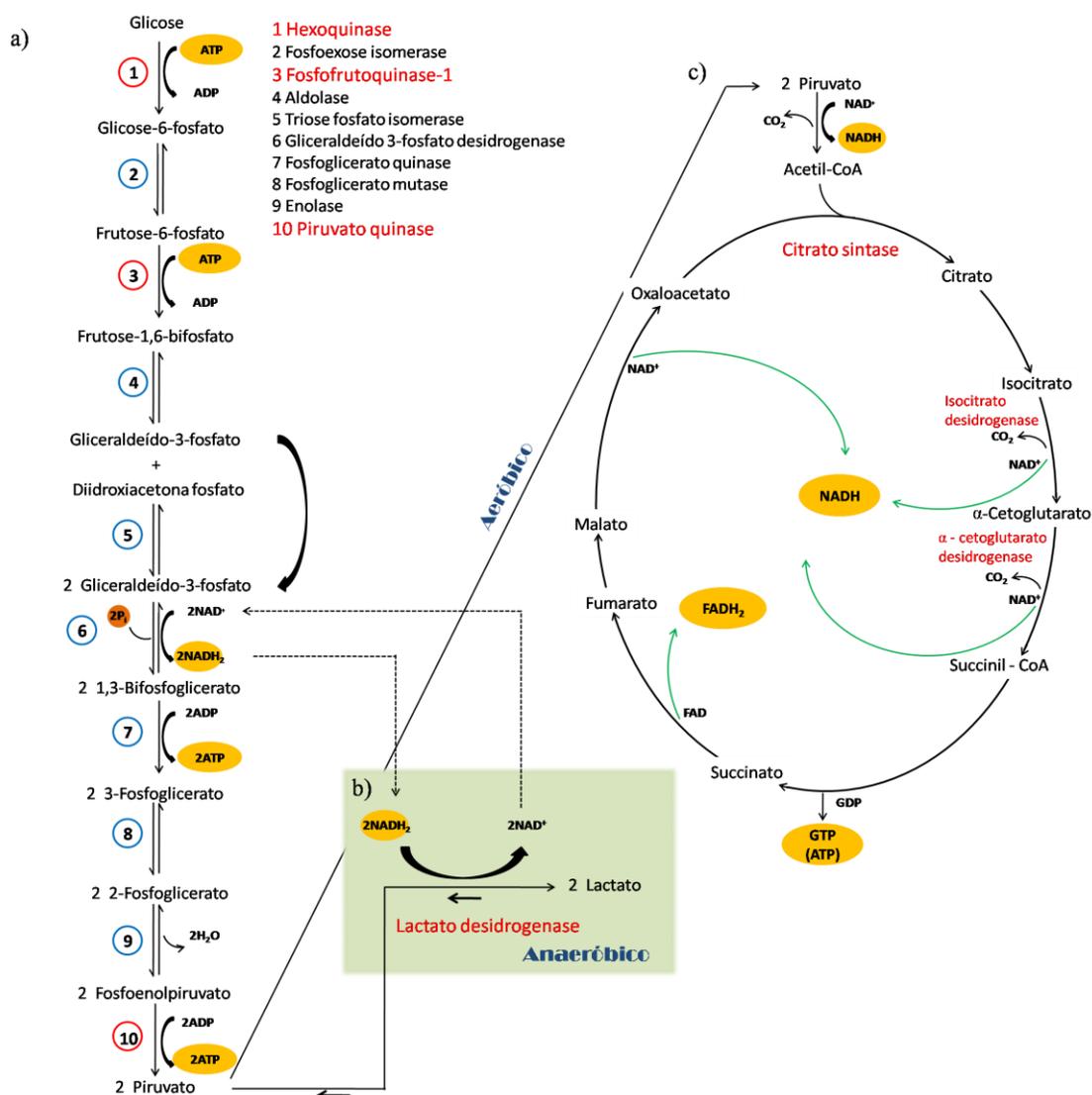


Figura 1. Respiração celular: a) Glicólise aeróbica, b) Glicólise anaeróbica, c) Ciclo de Krebs. As enzimas chaves analisadas no presente estudo estão destacadas em vermelho.

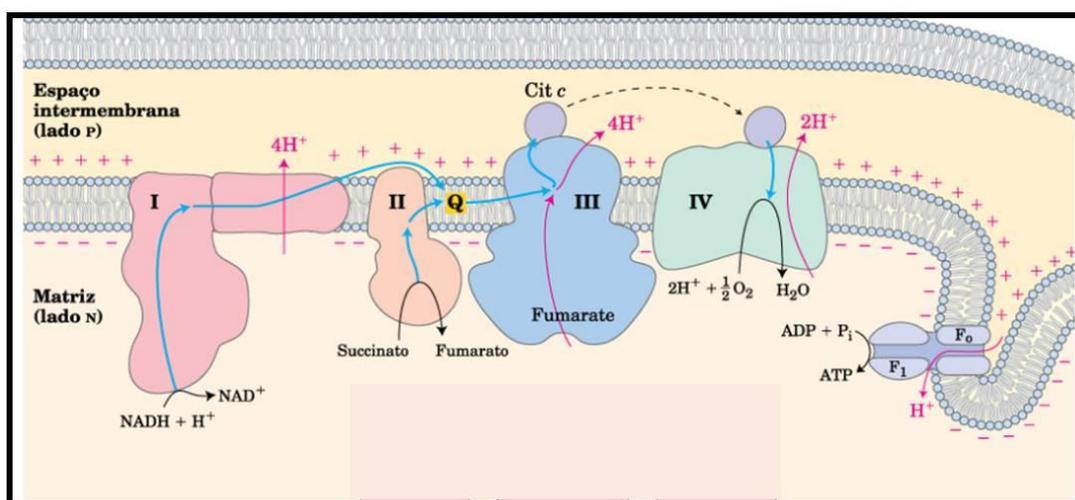


Figura 2. Cadeia transportadora de elétrons. Fonte: Nelson & Cox, 2008.

Os efeitos da redução do pH da água do mar sobre o metabolismo energético têm sido relatados em diversos invertebrados marinhos, incluindo os corais. Entre os efeitos em nível fisiológico, foram observados desequilíbrio do equilíbrio ácido-base, redução na capacidade de transporte de oxigênio, estresse oxidativo (Fabry *et al.*, 2008; Mostofa *et al.*, 2016), reduções das taxas de calcificação e crescimento, incremento da taxa de fotossíntese (Doney *et al.*, 2009; Kroeker *et al.*, 2013) e branqueamento (Dove & Hoegh-Guldberg, 2006; Edmunds, 2012). Em larvas, foram relatadas diminuições das taxas de consumo de oxigênio, metamorfose e assentamento larval (Nakamura *et al.*, 2011; Edmunds *et al.*, 2013; Rivest & Hofmann, 2014). Sabe-se ainda que a resposta dos organismos aos efeitos agudos da acidificação é dependente da espécie e do tempo de exposição (Lesser, 2006; Gattuso & Hansson, 2011; Edmunds, 2012; Kroeker *et al.*, 2013; Kaniewska *et al.*, 2015).

Com base no exposto acima, o presente estudo testou a hipótese de que a exposição a uma redução no pH da água do mar diminuiria a atividade de enzimas-chave do metabolismo energético no hidrocoral *M. alvicornis*, como consequência da

diminuição da concentração de CO_3^{-2} e incremento de H^+ na água do mar, implicando assim em alteração no custo energético do hidrocoral, a qual poderia ser refletida por modificações na atividade das enzimas-chave avaliadas. É importante salientar que ainda não existem estudos relatados na literatura sobre os efeitos da acidificação marinha na atividade de enzimas-chave do metabolismo energético de hidrocorais da família Milleporidae. Espera-se, portanto, que os resultados do presente estudo forneçam informações inéditas e auxiliem na interpretação das respostas das mileporas à acidificação marinha, sendo que estes hidrocorais têm um papel fundamental na sustentação dos ecossistemas recifais brasileiros.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar um possível efeito da acidificação marinha no metabolismo energético do hidrocoral *Millepora alcicornis*.

2.2. Objetivo específico

Avaliar os efeitos da redução do pH da água do mar nas atividades de enzimas-chave do metabolismo energético (hexoquinase, fosfofrutoquinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase e citrato sintase) no hidrocoral *M. alcicornis*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local de amostragem

O Recife de Fora é um pequeno recife, com uma área de aproximadamente 2,5 km², que se encontra no complexo recifal de Abrolhos, ao sul do Estado da Bahia (Leão *et al.*, 2003). Ele está situado a aproximadamente 9 km de Porto Seguro (BA), entre as latitudes 16°23'30" S e 16°25'06" S e as longitudes 38°58'30" W e 38°59'18" W (Sarmiento *et al.*, 2015). Este recife pertence ao Parque Municipal Marinho Recife de Fora, criado em dezembro de 1997 (Castro & Pires, 2001), com o objetivo de proteger os recursos naturais do recife e ser utilizado como área para recreação, educação e pesquisa. A profundidade do Recife de Fora varia entre 6 e 16 m, sendo que na maré baixa este pode atingir uma profundidade de -0,20 m. Por sua vez, na maré alta ele pode atingir uma altura de 1,60 m (Seoane, *et al.*, 2008). A transparência da água no Recife de Fora é normalmente maior do que aquela observada em outros recifes, tais como Araripe, Itacipanema, Alagados e Naufrágio, que ficam mais próximo da costa e são mais afetados pelas descargas fluviais (Castro & Pires, 2001; Chaves *et al.*, 2010).

3.2. Coleta, aclimação e exposição dos hidrocorais à acidificação

Em outubro de 2012, fragmentos de quatro colônias de corais da espécie *M. alvicornis* (ponto 1: 16°24'32.41" S, 38°58'36.00" O; ponto 2: 16°25'1.16" S, 38°58'55.63" O; ponto 3; 16°24'39.92" S, 38°58'59.71" O; ponto 4: 16°24'31.33" S, 38°59'10.06" O) foram coletados através de mergulho autônomo no Parque Municipal Marinho Recife de Fora (Fig. 3). Os fragmentos foram transportados ao laboratório do "Projeto Coral Vivo" em Arraial d'Ajuda (Porto Seguro, BA), onde se localiza o mesocosmo marinho, no qual foi realizado a parte experimental do presente estudo.

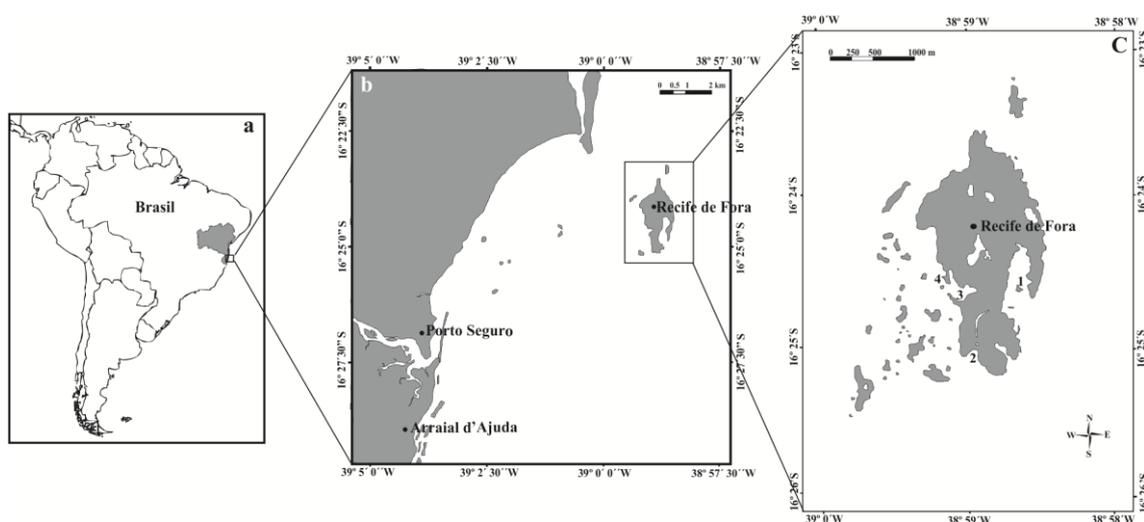


Figura 3. Linha de costa brasileira mostrando o Estado da Bahia (a), o distrito de Arraial d' Ajuda em Porto Seguro (b) e o Parque Municipal Marinho Recife de Fora (c).

O mesocosmo marinho é um sistema experimental ao ar livre que capta permanentemente água do mar em uma franja recifal adjacente, localizada a 500 m da costa da praia de Araçaípe. Este sistema permite que as variações naturais dos fatores físico-químicos do ambiente, tais como temperatura, pH, turbidez, salinidade, fase da lua, irradiação solar, fotoperíodo, regime de chuvas, concentração de nutrientes, plâncton, entre outros, também ocorram no ambiente experimental com a mesma frequência e intensidade. Assim, o mesocosmo permite a realização de estudos com maior realismo ecológico e replicação experimental possível. A estrutura e o funcionamento do sistema de mesocosmo utilizado no presente estudo foram descritos em detalhes por Duarte *et al.* (2015).

Os fragmentos de hidrocorais foram fixados em placas de cerâmica, organizados em grelhas de acrílico, colocados na parte inferior dos cochos do mesocosmo marinho e aclimatados por 20 dias (09 a 29/10/2012). Após aclimação, foi coletada uma amostra de cada colônia e estabelecidos os tratamentos de pH. Para a exposição à acidificação marinha, 8 fragmentos de cada colônia foram dispostos em 16 cochos e expostos aos

diferentes tratamentos de redução pH por 16 dias (29/10/2012 a 15/11/2012) ou 30 dias (29/10/2012 a 29/11/2012), sendo que cada tratamento foi realizado em quadruplicata (n = 4), conforme o desenho experimental mostrado na Figura 4.

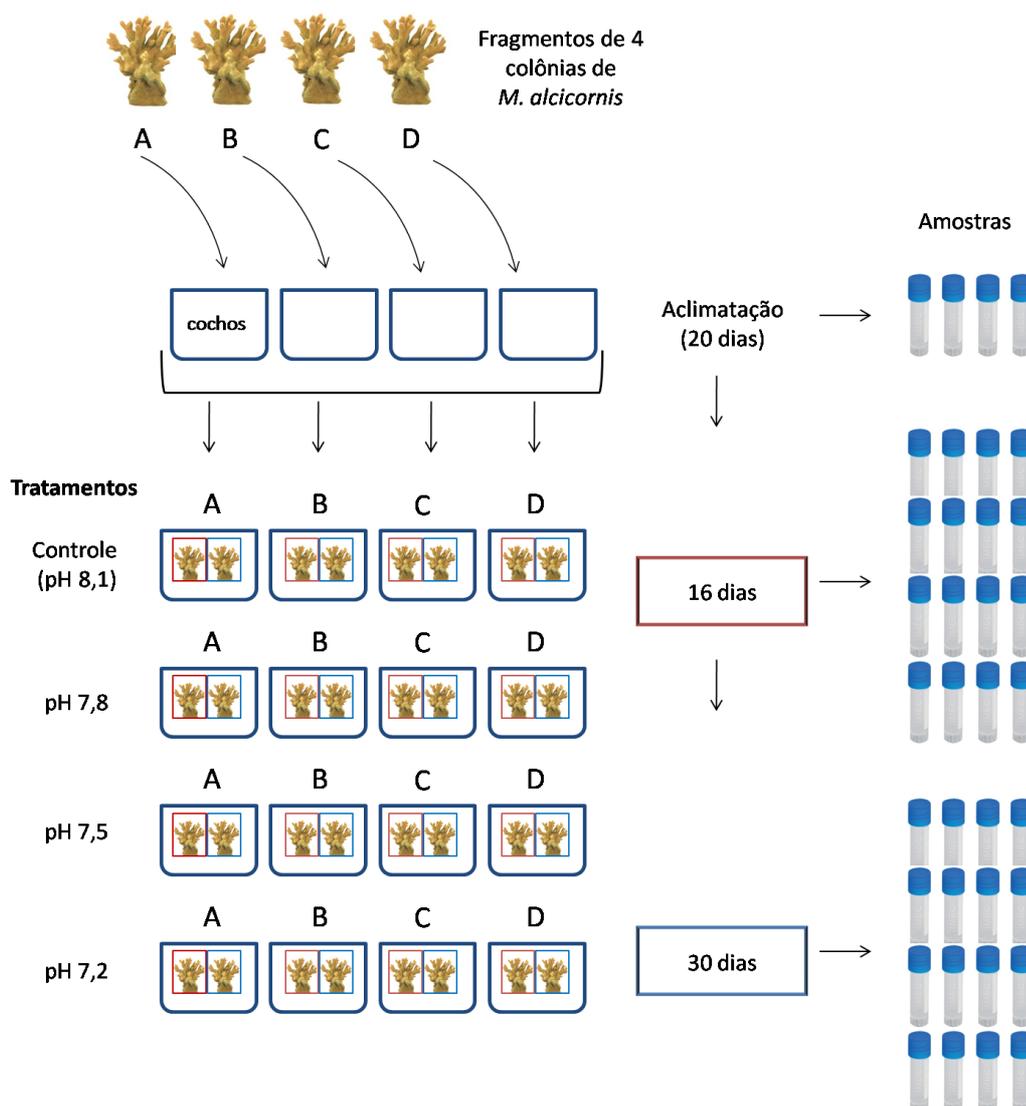


Figura 4. Desenho experimental utilizado no presente estudo. O esquema apresenta a disposição dos hidrocorais nos cochos do mesocosmo marinho durante o período de aclimação e exposição a três níveis de redução de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

Os diferentes níveis de acidificação da água do mar foram estabelecidos através de um sistema de reatores imersos em reservatórios que abasteciam os cochos e

forneciam CO₂ por burbulhamento (Duarte *et al.*, 2015; Sarmiento *et al.*, 2015). Cabe destacar que o experimento descrito por Sarmiento *et al.* (2015) foi realizado simultaneamente ao experimento relatado no presente estudo. Assim, ambos os estudos foram realizados no mesocosmo marinho do Projeto “Coral Vivo” e, portanto, sob as mesmas condições físico-químicas. Nesse sentido, cabe salientar então que os resultados dos valores das medidas dos tratamentos de pH testados e demais parâmetros ambientais de interesse para o presente estudo já foram descritos anteriormente no estudo reportado por Sarmiento *et al.* (2015).

O pH controle, sem adição experimental de CO₂, é aquele considerado o medido na água do mar no momento da captação da mesma pelo mesocosmo, estando esta condição, portanto, também sujeita às variações naturais de pH. Por sua vez, os três níveis de redução de pH testados corresponderam a 0,3, 0,6 e 0,9 unidades abaixo do pH da água do mar observado na situação controle. Estes níveis de acidificação foram estabelecidos conforme aqueles previstos pelo Painel Intergovernamental sobre Mudanças Climáticas (IPCC) para os anos 2100 e 2300, com base em projeções realizadas através de modelos atmosféricos sobre emissões de CO₂ (IPCC, 2013; 2014). A pressão parcial de CO₂ (pCO₂) na água do mar foi monitorada a cada 15 min, utilizando-se eletrodos de pH (Gehaka 09RBCN) submersos em cada reservatório e acoplados a um sistema computadorizado (Reef Angel Controller). O "Reef Angel" é um controlador de código aberto, que permitiu que cada nível de acidificação seguisse as variações naturais do pH da água do mar, constituindo assim um sistema senoidal de monitoramento. No momento em que a água do mar atingia o pH estabelecido para cada tratamento, o fornecimento de CO₂ era interrompido automaticamente. As medições do pH, bem como dos demais parâmetros ambientais, tais como temperatura, salinidade,

nutrientes, intensidade de luz, precipitações, alcalinidade total e estado de saturação da aragonita (Ω_{ar}) e calcita (Ω_{cal}), podem ser consultadas no estudo descrito por Sarmiento *et al.* (2015). Durante o experimento, os hidrocorais não receberam qualquer tipo de alimento (Sarmiento *et al.*, 2015), uma vez que o fluxo de água e a intensidade luminosa no mesocosmo suprem naturalmente as necessidades alimentares dos corais e de seus endosimbiontes (Duarte *et al.*, 2015).

Após exposição aos diferentes tratamentos de pH da água do mar, os fragmentos de hidrocorais foram coletados e acondicionados em tubos criogênicos, devidamente identificados e congelados em nitrogênio líquido para seu posterior transporte e análise no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Rio Grande (FURG).

3.3. Análise das atividades enzimáticas

As amostras congeladas foram maceradas em nitrogênio líquido com o auxílio de gral e pistilo, divididas em alíquotas e mantidas a -80°C em ultrafreezer (Indrel IULT 2005-D), para posterior análise das atividades enzimáticas. No momento das análises, cada alíquota da amostra ($\sim 0,5$ g) foi homogeneizada por ultrassom (sonicador Qsonic, modelo CL-188) em 300 μl de tampão de homogeneização [imidazol (50 mM) e fenilmetilsulfonilfluoreto (PMSF; 0,1 mM) dissolvido em metanol] previamente resfriado. Os homogeneizados das amostras foram centrifugados ($10000 \times g$, 4°C , 20 min) em tubos plásticos de 2 ml do tipo Eppendorf em uma centrífuga refrigerada (Sigma 3K30). O sobrenadante obtido foi utilizado como fonte das enzimas.

Cada ensaio enzimático foi preparado com todos os substratos necessários para gerar as condições ótimas para atividade das enzimas. A determinação das atividades

das enzimas foi realizada por espectrofotometria, seguindo o protocolo descrito por Lallier e Walsh (1991) e modificado por Lauer *et al.* (2012), utilizando-se uma leitora de microplacas (ELx808IU, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Cada amostra foi lida em 3 poças de uma microplaca de 96 poças, sendo que cada poça continha um volume final de 350 µl de solução de reação. Todas as leituras foram realizadas a 25°C.

As concentrações finais dos reagentes e suas respectivas faixas de leitura para cada ensaio enzimático foram as seguintes:

Hexoquinase: 15 µl de homogeneizado da amostra; imidazol 75 mM (pH 7,4); MgCl₂ 150 mM; D(+)glicose 10 mM; NAD⁺ 1,2 mM; glicose 6-fosfato desidrogenase de *Leuconostoc mesenteroides* 120 U/ml e ATP 60 mM. A determinação da atividade enzimática foi realizada através da medida da variação da absorbância (340 nm) da amostra causada pela redução de NAD⁺ a NADH.

Fosfofrutoquinase: 15 µl de homogeneizado da amostra; imidazol 75 mM (pH 7,4); MgCl₂ 150 mM; KCl 750 mM; ATP 60 mM; gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase de *L. mesenteroides* 37,5 U/ml; triosefosfato isomerase 112,5 U/ml; aldolase 50 U/ml; NADH 3 mM e frutose-6-fosfato 150 mM. A determinação da atividade enzimática foi realizada através da medida da variação da absorbância (340 nm) da amostra causada pela oxidação de NADH a NAD⁺.

Piruvato quinase: 15 µl de homogeneizado da amostra; imidazol 75 mM (pH 7,4); MgCl₂ 150 mM; KCl 750 mM; fosfoenolpiruvato 5 mM; NADH 3 mM; lactato desidrogenase 1500 U/ml e ADP 37,5 Mm. A determinação da atividade enzimática foi realizada através da medida da variação da absorbância (340 nm) da amostra causada pela oxidação do NADH a NAD⁺.

Lactato desidrogenase: 15 µl de homogeneizado da amostra; imidazol 75 mM (pH 7,4); NADH 3 mM e piruvato de sódio 7,7 mM. A determinação da atividade enzimática foi realizada através da medida da variação da absorbância (340 nm) da amostra causada pela oxidação do NADH a NAD⁺.

Citrato sintase: 15 µl de homogeneizado da amostra; HEPES 50 mM (pH 8,1) acetil-CoA 2,3 mM, ácido 5-5'-ditio-2- nitrobenzóico (DTNB) 3,5 mM e oxalacetato 3,5 mM. A medida da atividade enzimática foi realizada através da medida da variação da absorbância (412 nm) da amostra causada pela redução do DTNB a ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB).

A concentração de proteínas nos homogeneizados das amostras foi determinada utilizando-se um kit comercial de reagentes (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, EUA), baseado no método de Bradford (Bradford, 1976), com medida da absorbância da amostra em 550 nm.

3.4. Análises estatísticas

Os dados das condições físico-químicas da água do mar utilizada no mesocosmo foram expressos como média ± intervalo de confiança (IC) de 95%, sendo que estes dados foram previamente relatados por Sarmiento *et al.* (2015). Os dados das atividades enzimáticas foram expressos como média ± erro padrão (n = 4). Os pressupostos de homogeneidade de variâncias e normalidade dos dados foram testados através dos testes de Shapiro-Wilk e de Bartlett, respectivamente. Os dados das atividades da hexoquinase, fosfofrutoquinase e lactato desidrogenase foram transformados matematicamente (\log_{10}) para que cumprissem os pressupostos de normalidade dos dados e homogeneidade de variâncias. Assim, as médias das atividades enzimáticas

após a aclimação dos hidrocorais ao mesocosmo (tempo 0 dias) e após exposição destes aos tratamentos de pH (tempos 16 e 30 dias) foram comparados por análise de variância (ANOVA) de dois fatores (tempo de exposição e tratamento de pH). Foi aplicado o teste *a posteriori* de Tukey para identificar possíveis diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as médias dos grupos experimentais. As análises estatísticas dos dados foram realizadas utilizando-se o programa estatístico R, versão 3.2.3 (R Development Core Team, 2016).

4. SÍNTESE DOS RESULTADOS

4.1. Condições experimentais

Conforme já mencionado, os dados dos parâmetros físico-químicos de interesse para o presente estudo foram previamente relatados por Sarmiento *et al.* (2015). Como descrito por estes autores, observa-se que as flutuações de pH no mesocosmo na condição controle seguiram as variações diárias observadas na água do mar, como relatado anteriormente por Duarte *et al.* (2015). Isto ressalta a adequação do mesocosmo marinho para estudos onde existe o interesse em que as condições físico-químicas do ambiente, bem como suas variações, sejam preservadas no âmbito do experimento. Por sua vez, Sarmiento *et al.* (2015) demonstraram que os tratamentos nominais de pH testados no presente estudo foram satisfatoriamente mantidos (Tab. 1). Conforme desejado, os níveis de acidificação variaram de forma senoidal em função das variações naturais de pH observadas na condição controle (Fig. 5). Os valores de pressão parcial de CO₂ (pCO₂) para os tratamentos foram 351,8 (pH 8,1); 939,0 (pH 7,8); 1683,4 (pH 7,5) e 3494,3 μ atm (pH 7,2) (Sarmiento *et al.*, 2015).

4.2. Atividades enzimáticas

Nos hidrocorais mantidos sob condição controle de pH (8,1), não foram observadas variações significativas ($p > 0,05$) na atividade da hexoquinase (Fig. 6), fosfofrutoquinase (Fig. 7), piruvato quinase (Fig. 8), lactato desidrogenase (Fig. 9) e citrato sintase (Fig. 10) ao longo do período experimental (16 e 30 dias). Além disso, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) nas atividades das enzimas entre os hidrocorais mantidos na condição controle de pH e aqueles expostos a qualquer tratamento de redução do pH da água do mar.

Tabela 1. Condições físico-químicas mantidas no mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo durante a realização do presente estudo. Os dados são expressos como média \pm intervalo de confiança de 95% (Sarmiento *et al.*, 2015).

	pH			
	8,1	7,8	7,5	7,2
pH	8,10 0,004	7,74 0,008	7,51 0,006	7,21 0,007
Temperatura (°C)	25,19 0,03	25,00 0,03	25,16 0,03	- -
Salinidade	35 0,39	35 0,41	35 0,37	35 0,34
Luz ($\mu\text{mol fotons m}^{-2} \text{s}^{-1}$)	284,97 41,34	296,37 41,51	285,46 33,91	276,98 39,77
Nitrato (mg L^{-1})	0,98 0,20	0,98 0,15	0,88 0,05	0,85 0,06
Fosfato (mg L^{-1})	0,06 0,01	0,06 0,01	0,06 0,01	0,06 0,01

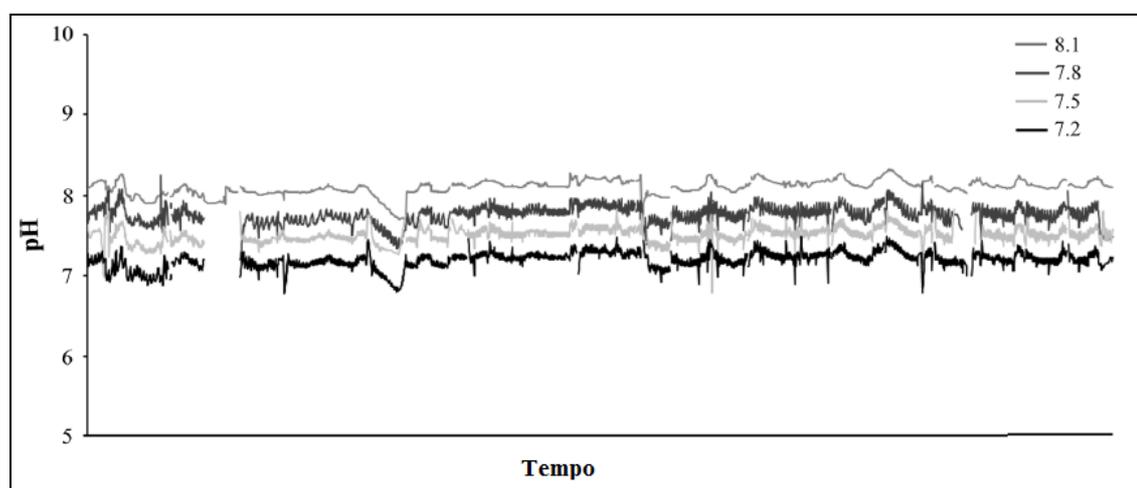


Figura 5. Monitoramento do pH da água do mar nos cochos do mesocosmo marinho do Projeto Coral Vivo durante o período de realização do presente estudo (Sarmiento *et al.*, 2015).

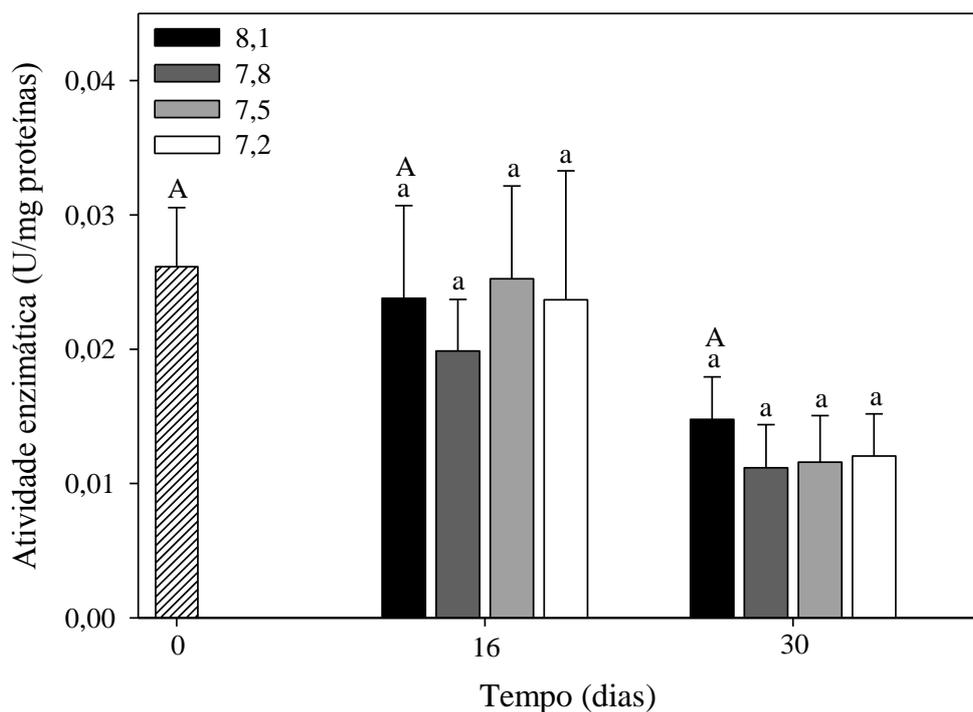


Figura 6. Atividade da hexoquinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

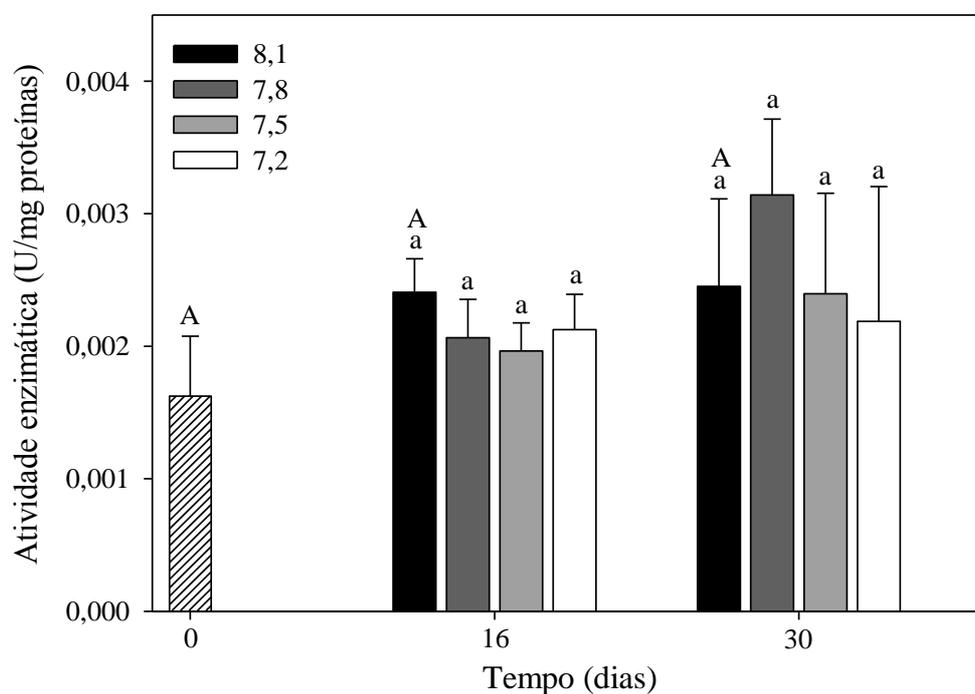


Figura 7. Atividade da fosfofrutoquinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

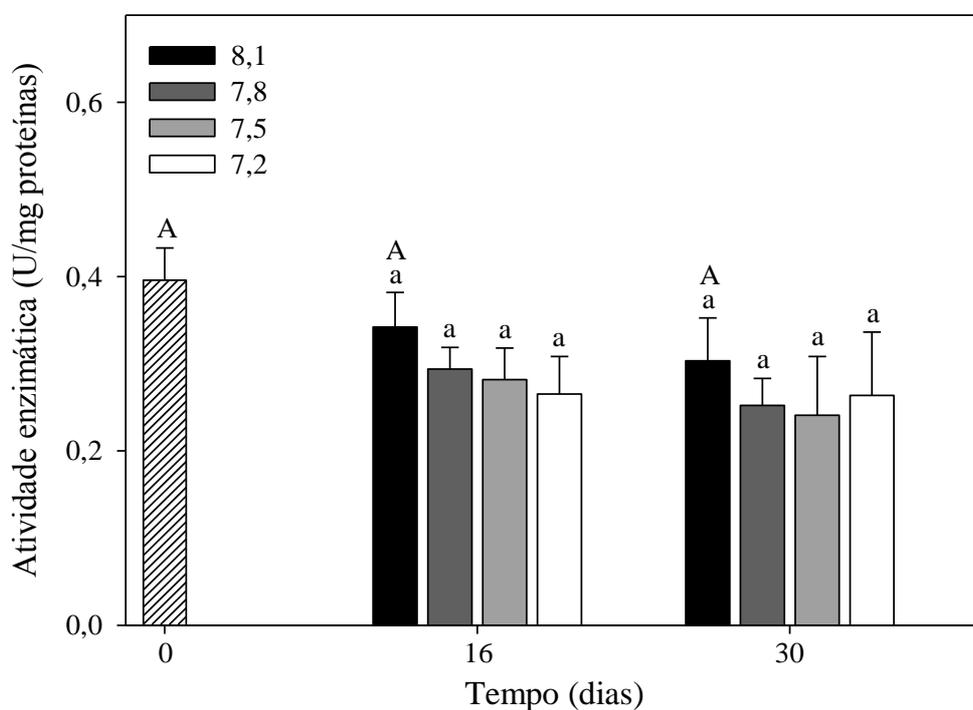


Figura 8. Atividade da piruvato quinase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

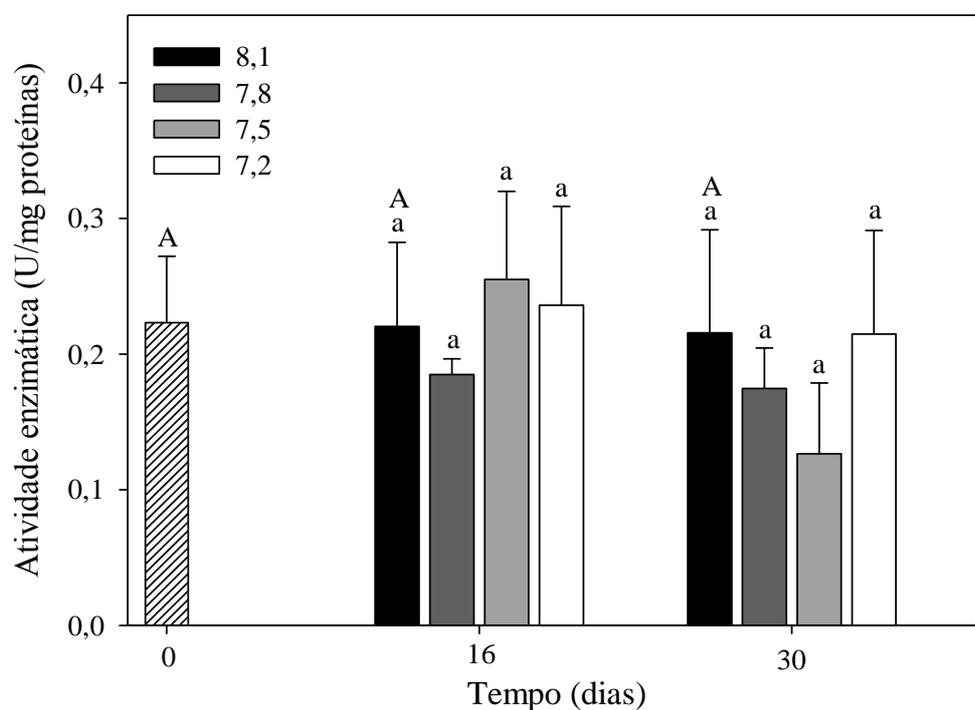


Figura 9. Atividade da lactato desidrogenase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

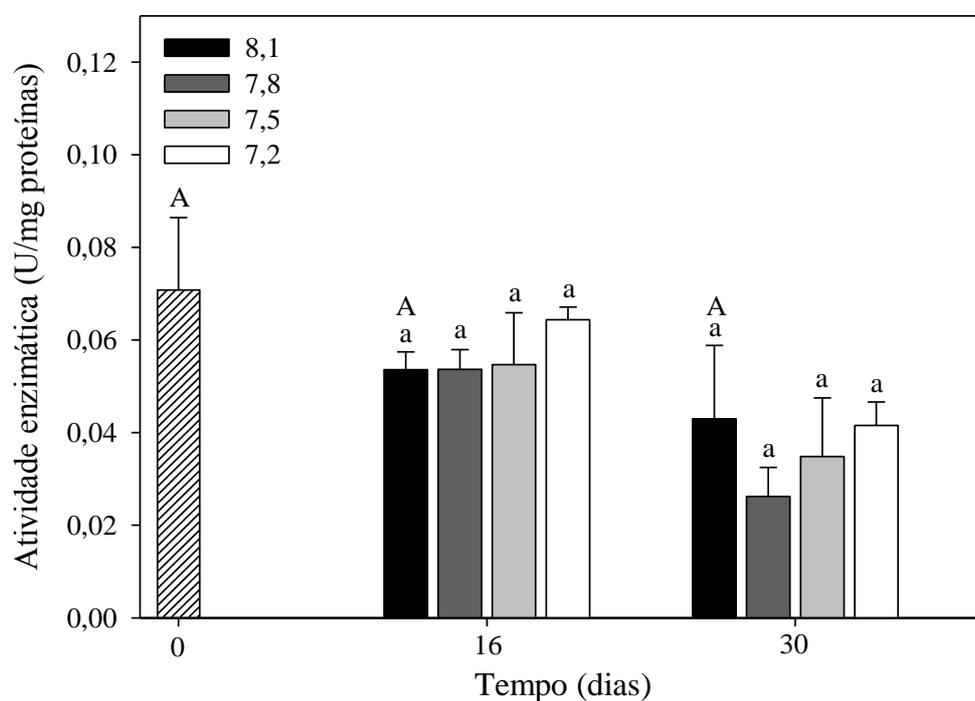


Figura 10. Atividade da citrato sintase no hidrocoral *Millepora alcicornis* após aclimação ao mesocosmo marinho (0 dias) e exposição a diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias. Os dados representam a média \pm desvio padrão ($n = 4$). Letras maiúsculas diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre a atividade dos corais aclimatados ao mesocosmo (tempo 0) e aqueles mantidos na condição controle (sem adição experimental de CO_2) por 16 e 30 dias. Letras minúsculas diferentes indicam diferenças significativas entre os hidrocorais expostos aos diferentes níveis de pH da água do mar por 16 e 30 dias.

5. CONCLUSÕES

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

- (1) A acidificação marinha não afetou o metabolismo energético do hidrocoral *M. alvicornis* nas condições utilizadas no presente estudo, uma vez que não foram observadas alterações significativas nas atividades da hexoquinase, fosfofrutoquinase, piruvato quinase, lactato desidrogenase e citrato sintase nos hidrocorais expostos aos diferentes níveis de redução de pH testados (7,8; 7,5 e 7,2), quando comparados àqueles mantidos na condição controle (pH 8,1);
- (2) o hidrocoral *M. alvicornis* é capaz de manter constante a atividade das principais vias metabólicas envolvidas na produção de energia durante o estresse ácido (pH > 7,2) a médio prazo (até 30 dias);
- (3) os efeitos significativos observados sobre a calcificação e as atividades da Ca-ATPase e da anidrase carbônica após exposição de *M. alvicornis* ao pH 7,2 por 30 dias (Marangoni *et al.*, 2016b) não estão associados a alterações significativas na produção de energia por este hidrocoral, uma vez que no presente estudo não foram observadas alterações significativas nas atividades de enzimas-chave do metabolismo energético do hidrocoral *M. alvicornis* nestas mesmas condições experimentais.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, BPA. 2011. Análise do Efeito da acidificação dos oceanos no desenvolvimento larvar de *Crassostrea gigas*. Dissertação de Mestrado, Universidade Nova de Lisboa, Brasil, 112 p.
- AL-LIHAIBI, SS, A AL-SOFYANI, GR NIAZ, VU AHMAD, M NOORWALA & FV MOHAMMAD. 2002. Long-chain wax esters and diphenylamine in fire coral *Millepora dichotoma* and *Millepora platyphylla* from Saudi Red Sea Coast. *Sci. Mar.*, 66(2): 95-102.
- AMARAL, FD, AQ STEINER, MK BROADHURST & SD CAIRNS. 2008. An overview of the shallow-water calcified hydroids from Brazil (Hydrozoa: Cnidaria), including the description of a new species. *Zootaxa*, 1930: 56–68.
- AMARAL, FD, MK BROADHURST, SD CAIRNS & E SCHLENZ. 2002. Skeletal morphometry of *Millepora* occurring in Brazil, including a previously undescribed species. *Proc. Biol. Soc. Wash.*, 115(3): 681-695.
- AMARAL, FD, MM HUDSON, AQ STEINER & CAC RAMOS. 2007. Corals and calcified hydroids of the Manuel Luiz Marine State Park (State of Maranhão, Northeast Brazil). *Biota Neotrop.*, 7, 73–81.
- AMARAL, FD, RS SILVA, L MAURICIO-DA-SILVA & AM SOLÉ-CAVA. 1997. Molecular systematics of *Millepora alcicornis* Linnaeus, 1758 and *M. braziliensis* Verril, 1868 (Hydrozoa: Milleporidae) from Brazil. *Proc. 8th Int. Coral Reef Sym.*, 2: 1577-1580.
- BAKER, AC. 2003. Flexibility and specificity in coral-algal symbiosis: Ecology and biogeography of *Symbiodinium*. *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 34:661-689.

- BERG, JM, JL TYMOCZKO & L STRYER. 2002. Biochemistry. 5th ed. W. H. Freeman and company. New York, NY, 1050 p.
- BERTUCCI, A, A MOYA, S TAMBUTTÉ, D ALLEMAND, CT SUPURAN & D ZOCCOLA. 2013. Carbonic anhydrases in anthozoan corals - A review. *Bioorg. Med. Chem.*, 21: 1437-1450.
- BHADURY, P. 2015. Effects of ocean acidification on marine invertebrates- a review. *Indian J. Mar. Sci.*, 44(4): 1-11.
- BIELMYER, GK, M GROSELL, R BHAGOLI, AC BAKER, C LANGDON, P GILLETTE & TR CAPO. 2010. Differential effects of copper on three species of scleractinian corals and their algal symbionts (*Symbiodinium spp.*). *Aquat. Toxicol.*, 97: 125-133.
- BIRKELAND, C. 1997. Life and Death of Coral reefs. Chapman and Hall, New York, 536 p.
- BOSCHMA H. 1948. The species problem in *Millepora*. *Zool. Verh. Leiden.*, 1: 3-115.
- BRADFORD, MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.
- BRITO, A, A RODRÍGUEZ, O MONTERROSO, A GONZÁLEZ, S CLEMENTE, J HERNÁNDEZ & F VIERA. 2010. Sobre la presencia de hidrocorales del género *Millepora* (Hydrozoa: Milleporidae) en el Atlántico Oriental Subtropical (Islas Canarias) y su relación con eventos climáticos. *Rev. Acad. Canar. Cienc.*, 3-4: 35-44.

- BROWN, D & PJ EDMUNDS. 2016. Differences in the responses of three scleractinians and the hydrocoral *Millepora platyphylla* to ocean acidification. *Mar. Biol.*,163:62.
- BRUSCA, RC & GJ BRUSCA. 2007. Invertebrados. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, Brasil, 968 p.
- BURKE, CHL & L PET-SOEDE. 2003. The economics of worldwide coral reef degradation. Cesar Environmental Economics Consulting, 23 p.
- CAIRNS, SD, BW HOEKSEMA & J VAN DER LAND. 1999. Appendix: List of the extant stony corals. *Atoll Res. Bull.*, 459, 13–46.
- CALDEIRA, K & M, WICKETT. 2005. Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J. Geophys. Res.* 110: 1-12.
- CASTRO CB & DO PIRES. 2001. Brazilian coral reefs: what we already know and what is still missing. *Bull. Mar. Sci.*, 69(2): 357–371.
- CHAVES LCT, JACC NUNES & CLS SAMPAIO. 2010. Shallow reef fish communities of South Bahia Coast, Brazil. *Braz. J. Oceanogr.*, 58: 33 – 56.
- CHEN-TUNG, AC & AV BORGES. 2009. Reconciling opposing views on carbon cycling in the coastal ocean: Continental shelves as sinks and near-shore ecosystems as sources of atmospheric CO₂. *Deep Sea Res. Part II*, (56): 578-590.
- CLEMENTE, S, A RODRÍGUEZ, A BRITO, A RAMOS, O MONTERROSO & JC HERNÁNDES. 2011. On the occurrence of the hydrocoral *Millepora* (Hydrozoa: Milleporidae) in the subtropical eastern Atlantic (Canary Islands): is the colonization related to climatic events? *Springer*, 30: 237:20.

- DAVY, SK, D ALLEMAND & VM WEIS. 2012. Cell biology of cnidarian-dinoflagellate symbiosis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 76: 229 – 261.
- DELGADILLO-NUÑO, MA, MA LIÑÁN-CABELLO, J REYES-GÓMEZ & O SORIANO-SANTIAGO. 2014. Response to pH stress in the reef-building coral *Pocillopora capitata* (Anthozoa: Scleractinia). *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.*, 49(3): 449-459.
- DE SOUZA, LK & CS HUTZ. 2008. Relacionamentos pessoais e sociais: amizade em adultos. *Psicol.Estud.*, 13(2): 257 – 265.
- DIXON, JA, LF SCURA & T VAN'T-HOF. 1993. Meeting ecological and economic goals: marine parks in the Caribbean. *Ambio*, 22: 117-125.
- DONEY, S, V FABRY, R FEELY & J KLEYPLAS. 2009. Ocean acidification: The other CO₂ problem. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 1:169-192.
- DOUGLAS, AE. 2003. Coral bleaching-how and why? *Mar. Pollut. Bull.*, 46: 385–392.
- DOVE, SG & O HOEGH-GULDBERG. 2006. The cell physiology of coral bleaching. Em: PHINNEY, JT, W SKIRVING, J KLEYPAS & O HOEGH-GULDBERG (eds.). *Coral Reefs and Climate Change: Science and Management*, American Geophysical Union, Washington, D.C., 55–71 p.
- DUARTE, G, EN CALDERON, CM PEREIRA, LFB MARANGONI, HF SANTOS, RS PEIXOTO, A BIANCHINI & CB CASTRO. 2015. A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecol. Evol.*, 1-12.
- EDMUNDS, PJ. 2012. Effect of pCO₂ on the growth, respiration, and photophysiology of massive *Porites* spp. in Moorea, French Polynesia. *Mar. Biol.*, 159: 2149–2160.

- EDMUNDS, PJ & CB WALL. 2014. Evidence that high pCO₂ affects protein metabolism in tropical reef corals. *Biol. Bull.*, 227: 68–77.
- EDMUNDS, PJ, VR CUMBO & F TUNG-YUNG. 2013. Metabolic costs of larval settlement and metamorphosis in the coral *Seriatopora caliendrum* under ambient and elevated pCO₂. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 443: 33–38.
- FABRY, VJ, BA SEIBEL, RA FEELY & JC ORR. 2008. Impacts of ocean acidification on marine fauna and ecosystem processes. *J. Mar. Sci.*, 65: 414–432.
- FURLA, P, D ALLEMAND, M SHICK, C FERRIER-PAGES, S RICHIER, A LANTIVAUX, P MERLE & S TAMBUTTÉ. 2005. The symbiotic anthozoan: a physiological chimera between alga and animal. *Integr. Comp. Biol.*, 45: 595-604.
- GARCÍA-ARREDONDO, A, A ROJAS, R IGLESIAS-PRIETO, A ZEPEDA-RODRIGUEZ & L PALMA-TIRADO. 2012. Structure of nematocysts isolated from the fire corals *Millepora alcicornis* and *Millepora complanata* (Cnidaria: Hydrozoa). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.*, 18(1): 109-115.
- GATTUSO, JP. 2015. A short summary of the current knowledge on ocean acidification. In: HILMI, N, D ALLEMAND, C KAVANAGH, D LAFFOLEY, M METIAN, D OSBORN & S REYNAUD (eds.). Bridging the gap between ocean acidification impacts and economic valuation: regional impacts of ocean acidification on fisheries and aquaculture. Gland, Suíça: IUCN, 136 p.
- GATTUSO, JP, D ALLEMAND & M FRANKIGNOULE. 1999. Photosynthesis and calcification at cellular, organismal and community levels in coral: a review on interactions and control by carbonate chemistry. *Amer. Zool.*, 39: 160-183.
- GATTUSO, JP, D YELLOWLEES & M LESSER. 1993. Depth- and light-dependent variation of carbon partitioning and utilization in the zooxanthellate scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 92: 267-276.

- GATTUSO, JP, M FRANKIGNOULLE, SV SMITH, JRWARE, R WOLLAST, RW BUDDEMEIER & H KAYANNE. 1996. Coral reefs and carbon dioxide. *Science*, 271: 1298-1300.
- GATTUSO, JP & L HANSSON. 2011. Ocean acidification. Oxford University Press, New York, 326 p.
- GIBBIN, EM, HM PUTNAM, SK DAVY & RD GATES. 2014. Intracellular pH and its response to CO₂-driven seawater acidification in symbiotic versus non-symbiotic coral cells. *J. Exp. Biol.*, 217: 1963-1969.
- GIERZ, SL, BR GORDON & W LEGGAT. 2016. Integral light-harvesting complex expression in *Symbiodinium* within the coral *Acropora aspera* under thermal stress. *Sci. Rep.*, 6 (25081): 1 – 10.
- GLYNN, PW, JL MATÉ, AC BAKER & MO CALDERÓN. 2001. Coral bleaching and mortality in Panama and Ecuador during the 1997–1998 El Niño–Southern Oscillation event: spatial/temporal patterns and comparisons with the 1982–1983 event. *Bull. Mar. Sci.*, 69(1): 79-109.
- HILL RW, GA WYSE & M ANDERSON. 2012. Fisiologia Animal. 2^a ed. Editorial Artmed S.A. Porto Alegre, Brasil. 894 p.
- HOLCOMB, M, AA VENN, E TAMBUTTE, S TAMBUTTE, D ALLEMAND, J TROTTER, J. & M MCCULLOCH. 2014. Coral calcifying fluid pH dictates response to ocean acidification. *Sci. Rep.*, 4(5207): 1 – 4.
- IBARRA-ALVARADO, C, JA GARCÍA, MB AGUILAR, A ROJAS, A FALCÓN & EP HEIMER DE LA COTERA. 2007. Biochemical and pharmacological characterizations obtained from the fire coral *Millepora complanata*. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.*, 146(4):511-518.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). 2013. Climate Change 2013: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Cambridge University Press, New York, NY, USA, 203 p.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGE (IPCC). 2014. Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change [Core Writing Team, Pachauri, RK & LA Meyer (eds.)], Geneva, Suíça, 151 p.

THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR REEF STUDIES (ISRS), 2015. Climate Change Threatens the Survival of Coral Reefs. Consensus Statement on Climate Change and Coral Bleaching, October 2015. Prepared for the 21st Session of the Conference of the Parties to the United Nations Framework Convention on Climate Change, Paris, December 2015, 4 p.

KANIEWSKA, P, C-KK CHAN, D KLINE, EYS LING, N ROSIC & D EDWARDS. 2015. Transcriptomic changes in coral holobionts provide insights into physiological challenges of future climate and ocean change. *Plos One*, 10(10): e0139223.

KANIEWSKA, P, PR CAMPBELL, DI KLINE, M RODRIGUEZ-LANETTY & DJ MILLER. 2012. Major cellular and physiological impacts of ocean acidification on a reef building coral. *Plos One*, 7(4): e34659.

KINSEY, DW & D HOPLEY. 1991. The significance of coral reefs as global carbon sinks - response to greenhouse. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol*, 89: 363–377.

KROEKER, KJ, LR KORDAS, R CRIM, IE HENDRIKS, R RAMAJO, GS SINGH, CM DUARTE & JP GATTUSO. 2013. Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biol.*, 19: 1884–1896.

- LALLIER, FH & PJ WALSH. 1991. Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bull. Mar. Sci.*, 48: 665-669.
- LAUER, MM, CB OLIVEIRA, NLI YANO & A BIANCHINI. 2012. Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp. Biochem. Physiol. C*, 156: 140-147.
- LAURENT, J, S TAMBUTTÉ, E TAMBUTTÉ, D ALLEMAND & A VENN. 2013. The influence of photosynthesis on host intracellular pH in scleractinian coral. *J. Exp. Biol.*, 216: 1398-1404.
- LE QUÉRÉ, C, MR RAUPACH, JG CANADELL, G MARLAND, L BOPP, P CIAIS, TJ CONWAY, SC DONEY, RA FEELY, P FOSTER. 2009. Trends in the sources and sinks of carbon dioxide. *Nature Geosci.*, 2: 831-836.
- LEAL, MC, R CALADO, C SHERIDAN, A ALIMONTI & R OSINGA. 2013. Coral aquaculture to support drug discovery. *Elsevier*, 31(10): 555-561.
- LEÃO, ZMAN, RKP KIKUCHI & V TESTA. 2003. Corals and coral reefs of Brazil. In: Cortés J (ed.). *Latin American Coral Reefs*, *Elsevier*, 9-52.
- LEÃO, ZMAN, RKP KIKUCHI & MDM OLIVEIRA. 2008. Coral bleaching in Bahia reefs and its relation with sea surface temperature anomalies. *Biota Neotrop.*, 8(3): 69 – 82.
- LESSER, MP. 2006. Oxidative stress in marine environments: Biochemistry and Physiological Ecology. *Annu. Rev. Physiol.*, 68: 253 – 78.
- Lesser, MP, VM Weisb, MR Patterson & PL Jokiel. 1994. Effects of morphology and water motion on carbon delivery and productivity in the reef coral, *Pocillopora*

damicornis (Linnaeus): Diffusion barriers, inorganic carbon limitation, and biochemical plasticity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 178: 153-179.

LEWIS, JB. 1992. Heterotrophy in corals: zooplankton predation by the hydrocoral *Millepora complanata*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 90: 251-256.

LEWIS, JB. 2006. The Biology and Ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv. Mar. Biol.*, 50: 1-55.

LOYA, Y, K SAKAI, K YAMAZATO, Y NAKANO, H SAMBALI & R VAN WOESIK. 2001. Coral bleaching: the winners and the losers. *Ecol. Lett.*, 4: 122 – 131.

MANCHENKO GP, V A MOSCHENKO & VS ODINTSOV. 1993. Biochemical Genetics and Systematics of *Millepora* (Coelenterata: Hydrozoa) from the Shore of South Vietnam. *Biochem. Syst. Ecol.*, 21(6/7): 729-735.

MARANGONI LFB, L, JÁ MARQUES & A BIANCHINI. 2016a. Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. Em: ZILBERBERG, C, D PINTO A, JA MARQUES, L FEITOSA M & L FERNANDES DE BARROS M (eds.). Conhecendo os recifes brasileiros. Rede de Pesquisas Coral Vivo. Série Livros 58, Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, 364 p.

MARANGONI LFB, EM CALDERON, JÁ MARQUES, GAS DUARTE, CM PEREIRA, CB CASTRO, A BIANCHINI. 2016b. Effects of CO₂-driven acidification of sea water on the calcification process in the calcareous hydrozoan *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758). Coral Reefs, submitted.

MOBERG, F & C FOLKE. 1999. Ecological goods and services of coral reef ecosystems. *Ecol. Econ.*, 29: 215 – 233.

- MOSTOFA, KMG, CQ LIU, WD ZHAI, M MINELLA, D VIONE, K GAO, D MINAKATA, T ARAKAKI, T YOSHIOKA, K HAYAKAWA, E KONOHIRA, E TANOUE, A AKHAND, A CHANDA, B WANG, H SAKUGAWA. 2016. Reviews and Syntheses: Ocean acidification and its potential impacts on marine ecosystems. *Biogeosciences*, 13: 1767–1786.
- MURPHY, JWA & RH RICHMOND. 2016. Changes to coral health and metabolic activity under oxygen deprivation. *PeerJ*, DOI 10.7717/peerj.1956: 1-16.
- NAKAMURA, M, S OHKI, A SUZUKI & K SAKAI. 2011. Coral larvae under ocean acidification: survival, metabolism, and metamorphosis. *Plos One*, 6(1): e14521.
- NATIONAL OCEANIC AND ATMOSPHERIC ADMINISTRATION (NOAA). 2015. Trends in Atmospheric Carbon Dioxide - Global. Disponível em: http://www.esrl.noaa.gov/gmd/ccgg/trends/global.html#global_data. Acessado em 5 de dezembro de 2015.
- NELSON, DL & MM COX. 2008. Lehninger: Principles of biochemistry. 5th ed. W. H. Freeman and company. New York, United States. 1274 p.
- NUNES, J. 2013. Endemismo e conectividade de corais de fogo (*Millepora* spp.) no Oceano Atlântico. Dissertação (Mestrado em Ecologia), Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, 122 p.
- OBURA, D, D FENNER, B HOEKSEMA, L DEVANTIER & C SHEPPARD. 2008. *Millepora alcicornis*. In: IUCN 2016. A Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN de 2008. Acessado em 10 de janeiro de 2016.
- OLIVEIRA DM, M, ZMAN LEÃO & RKP KIKUCHI. 2008. Cultivo de *Millepora alcicornis* como uma ferramenta para restauração e manejo dos ecossistemas recifais do Nordeste do Brasil. *Rev. Gest. Cost. Integ.*, 8(2):183-201.

- PENDLETON, LH. 1995. Valuing coral reef protection. *Ocean Coastal Manag.*, 26(2): 119-131.
- PEREIRA, PH, IC LEAL, ME DE ARAUJO & AT SOUZA. 2012. Feeding association between reef fishes and the fire coral *Millepora* spp. (Cnidaria: Hydrozoa). *Mar. Biodivers. Rec.*, 5; e42: 1-4.
- PEREIRA DOS SANTOS, PMR & HME MARCONDES. 1990. Atmosfera, fluxos de carbono e fertilização por CO₂. *Estud. Av.*, 4(9): 204-220.
- PETERSON, CH & J LUBCHENCO. 1997. On the value of marine ecosystems to society. Em: DAILY, GC (ed.). *Nature's Services. Societal Dependence on Natural Ecosystems*. Island Press, New York, pp. 177-194.
- PONCE, T. 2009. Microsymbiontes associados a *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758) (Cnidaria, Hydrozoa) dos recifes costeiros de Picãozinho, João Pessoa-PB. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal da Paraíba, 129 p.
- RANDALL, D, W BURGGREN & K FRENCH. 2000. Eckert: Fisiologia Animal. Mecanismos e Adaptações. 5ª ed. Editora Guanabara Koogan LTDA, 729 p.
- R CORE TEAM. 2016. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Disponível em: <http://www.R-project.org/>. Acessado em 11 julho de 2016.
- RUIZ-RAMOS, DV, E WEIL & NV SCHIZAS. 2014. Morphological and genetic evaluation of the hydrocoral *Millepora* species complex in the Caribbean. *Zoo. Stud.*, 53(4): 2-15.
- RIVEST, EB & GE HOFMANN. 2014. Responses of the metabolism of the larvae of *Pocillopora damicornis* to ocean acidification and warming. *Plos One*, 9(4): e96172.

- SABINE, CL, RA FEELY, N GRUBER, RM KEY, K LEE, JL BULLISTER, R WANNINKHOF, S WONG, D WALLACE, B TILBROOK, FJ MILLERO, T PENG, A KOZYR, T ONO & AF RIOS. 2004. The oceanic sink for anthropogenic CO₂. *Science*, 305(5682): 367-371.
- SARMENTO, VC, TP SOUZA, AM ESTEVES & PJP SANTOS. 2015. Effects of seawater acidification on a coral reef meiofauna community. *Coral Reefs*, 34 (3): 955-966.
- SEOANE, JCS, RCM ARANTES, CB CASTRO, E TEDESCO & LS LOPES. 2008. Atlas do Mapeamento Físico do Parque Municipal Marinho do Recife de Fora, Porto Seguro, BA. Disponível online em: <http://coralvivo.org.br/wp-content/uploads/revista/959/Default.html> . Acessado em julho 2016.
- TEH, LSL, LCL THE & UR SUMAILA. 2013. A global estimate of the number of coral reef fishers. *PLoS One*, 8: e65397.
- VENN, AA. 2014. The role of pH regulation in coral symbiosis and biomineralization. 4th Coral Reef Ecology Symposium. Disponível em: <http://coresymposium.wordpress.com/>. Acesso em 7 de dezembro de 2015.
- VIDAL-DUPIOL, J, D ZOCCOLA, E TAMBUTTE, C GRUNAU & C COSSEAU 2013. Genes related to ion-transport and energy production are upregulated in response to CO₂-driven pH decrease in corals: new insights from transcriptome analysis. *PloS One*, 8(3): e58652.
- WEEBER, A, S SWART & PMS MONTEIRO. 2015. Seasonality of sea ice controls interannual variability of summertime Ω_A at the ice shelf in the Eastern Weddell Sea – an ocean acidification sensitivity study. *Biogeosciences Discuss.*, 12: 1653–1687.

WILLIAMS, EH & L BUNKLEY-WILLIAMS. 1990. The world-wide coral reef bleaching cycle and related sources of coral mortality. *Atoll Res. Bull.*, 335:1-71.

WOOLDRIDGE, S. 2013. A new conceptual model of coral biomineralisation: hypoxia as the physiological driver of skeletal extension. *Biogeosciences*, 10: 2867–2884.

YELLOWLEES, D, TA REES & W LEGGAT. 2008. Metabolic interactions between algal symbionts and invertebrate hosts. *Plant. Cell Environ.*, 5:679-694.

ZEEBE, R. 2011. Marine carbonate chemistry. Disponível em: <http://www.eoearth.org/view/article/154468>. Acesso em 7 de dezembro de 2015.

7. ANEXO

Does marine acidification affect the energy metabolism in the hydrocoral *Millepora alcicornis*?

Andrea Carlina Jesulich, Mariana Machado Lauer, Emiliano Nicolas Calderon, Laura Fernandes de Barros Marangoni, Joseane Aparecida Marques, Cristiano Macedo Pereira, Gustavo Adolpho Santos Duarte, Débora de Oliveira Pires, Clovis Barreira e Castro, Emiliano Nicolas Calderon, Adalto Bianchini

Artigo de acordo com as normas para submissão do artigo no periódico *Coral Reefs*.

Does marine acidification affect the energy metabolism in the hydrocoral *Millepora alcicornis*?

Andrea Carlina Jesulich¹; Mariana Machado Lauer²; Laura Fernandes de Barros Marangoni¹; Joseane Aparecida Marques¹; Cristiano Macedo Pereira³, Gustavo Adolpho Santos Duarte³, Débora de Oliveira Pires³, Clovis Barreira e Castro³, Emiliano Nicolas Calderon³; Adalto Bianchini^{2*}

¹Pós-Graduação em Oceanografia Biológica, Instituto de Oceanografia, Universidade Federal do Rio Grande, Av. Itália km 8, Rio Grande, RS, Brazil, 96203-900.

²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio Grande. Av. Itália km 8, Rio Grande, RS Brazil, 96203-900.

³Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Parque Quinta da Boa Vista, São Cristovão, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, 20940-040.

E-mails: ACJ: jesulichandrea@gmail.com; MML: mariana.lauer@gmail.com; LFBM: laurafbmarangoni@gmail.com; JAM: jmarques.oceano@gmail.com; CMP: cristiano.pereira@coralvivo.org.br; GASD: gustavo.duarte@coralvivo.org.br; DOP: debora.pires@coralvivo.org.br; CBC: clovis.castro@coralvivo.org.br; ENC: calderon@nm.ufrj.br; AB: adaltobianchini@furg.br.

*Corresponding author: Adalto Bianchini; Universidade Federal do Rio Grande, Instituto de Ciências Biológicas; Av. Itália km 8, Campus Carreiros, 96.203-900 - Rio Grande (RS) - Brazil; phone: +55 53 3293 5193

Keywords: Bleaching, Enzymes, Metabolism, Hydrozoa, Ocean acidification, Reefs

Abstract

Ocean acidification is one of the major global threats to coral reefs worldwide. It may compromise the energy production in calcifying organisms, such as the hydrocoral *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758). In the present study, a mesocosm experiment was conducted in November 2012 to investigate whether three levels of decreasing pH (7.8, 7.5 and 7.2, with respect to control sea water pH at 8.1) altered the activity of key enzymes involved in energy metabolism of *M. alcicornis*. Hydrocorals were acclimated for 20 d to the mesocosm conditions and exposed to the different levels of sea water pH for 16-d and 30-d. Results show that enzyme activities did not significantly change in a wide range of sea water pH (7.2-8.1). This finding indicates that *M. alcicornis* was able to maintain the activity of the major pathways involved in energy production under acidifying conditions. Therefore, *M. alcicornis* bleaching observed during events of ocean acidification cannot be ascribed to impairment in the major energy metabolism pathways.

Introduction

Ocean acidification (OA) refers to the decrease in sea water pH resulting from oceanic absorption of atmospheric CO₂ emissions associated with anthropogenic sources. It leads to changes in both the carbonate buffer system and calcium carbonate (CaCO₃) saturation state of oceans, which are expected to intensify in the future. At present, the pH of surface sea water is 8.10 (Gattuso 2015); however, this is projected to decrease to between 7.8 and 7.6 by the year 2100 (Bhadury 2015) and to as low as 7.3

by the year 2300 (Caldeira and Wickett 2005). While OA will likely affect all marine ecosystems, coral reefs represent one of the most sensitive to these environmental changes due to their delicate and complex physiology (Holcomb et al. 2014; Venn 2014). Among the most important builders of coral reefs in the world's tropical seas are the hydrocorals of Milleporidae family and, like most scleractinians, may be affected by OA (Lewis 2006).

Corals regulate pH at the site of calcification in relation to the surrounding sea water to promote the formation of calcareous skeleton (Venn 2014). However, under OA scenarios, the pH at the site of calcification can be altered and compromise calcification rates (Marangoni et al. 2016a). Additionally, the increase of H^+ in the water column and therefore the sea water in the gastrovascular cavity of the polyp (Holcomb et al. 2014) would be expected to cause increases in holobiont energy expenditure or changes in energy allocation (Vidal-Dupiol et al. 2013; Edmunds and Wall 2014; Kaniewska et al. 2015).

However, little is known about the effects of reducing sea water pH on the activity of key enzymes for energy metabolism in *Millepora alcicornis*. Specifically, the present study evaluates the effects of OA on the activity of hexokinase, phosphofruktokinase, pyruvate kinase and lactate dehydrogenase, key enzymes of the glycolysis pathway, as well as citrate synthase, a key enzyme of the Krebs cycle, in the hydrocoral *M. alcicornis*.

Materials and methods

Coral collection, acclimation and treatment

Branches of four colonies of *M. alcicornis* were collected in October 2012 in the Recife de Fora Municipal Marine Park (Porto Seguro, Bahia, Brazil southeastern; S 16°24'37.3", W 38°59'02.2"). Hydrocorals were acclimated for 20-d in the marine mesocosm system of the Coral Vivo Project (Arraial d'Ajuda, Porto Seguro).

It is noteworthy that the experiment of the present study was conducted in parallel with the experiment of Sarmiento et al. (2015). A detailed description of the physical characteristics, function and experimental setup can be reviewed in Sarmiento et al. (2015) and Duarte et al. (2015). Briefly, mesocosm conditions were maintained at three levels of decreasing pH (7.8, 7.5 and 7.2) relative to a sea water control (pH 8.1). Each treatment, performed in quadruplicate, was based on predictions made by models of atmospheric CO₂ emissions projected for the years 2100 and 2300 (Caldeira and Wickett 2005; IPCC 2014). The monitoring and measurement of pCO₂, pH, temperature, salinity, nutrients (nitrate and phosphate), light intensity, precipitation, total alkalinity, and saturation state of aragonite (Ω_{ar}) and calcite (Ω_{cal}) were previously reported in detail by Sarmiento et al. (2015).

Coral samples were collected after 16-d and 30-d of exposure in respective treatments. Branches were macerated in liquid nitrogen with the aid of a mortar and pestle. Macerated samples were divided into aliquots and stored in liquid nitrogen in cryogenic tubes, and frozen at -80°C until analyses of enzyme activities.

Glycolysis and Krebs cycle enzyme assays

Glycolytic and Krebs cycle enzymes were analyzed according to Lallier and Walsh (1991) and Lauer et al. (2012), with slight modifications. Each aliquot (~0.5 g) was homogenized with the aid of a sonicator (Qsonic Model CL-188) in ice-cold buffer

(50 mM imidazole; 0.1 mM PMSF; pH 7.8). The homogenate was then centrifuged (10,000 g; 20 min; 4°C) and the supernatant was used as the enzyme source. Enzymes were assayed spectrophotometrically using a microplate reader (ELx808IU, BioTek Instruments, Winooski, VT, USA). Glycolytic enzyme (hexokinase; phosphofructokinase; pyruvate kinase; lactate dehydrogenase) assays were performed in an imidazole buffer solution (75 mM; pH 7.4). Sample absorbance associated with NAD⁺/NADH oxidation/reduction was followed at 340 nm. Krebs cycle enzyme (citrate synthase) assay was performed in a HEPES buffer solution (50 mM; pH 8.1). Sample absorbance associated with 5-5'-dithio-2-nitrobenzoic (DTNB) reduction was followed at 412 nm.

All assays were performed at 25°C and specific conditions were used for each assay as follows (final concentrations): hexokinase (150 mM MgCl₂, 10 mM D-glucose, 1.2 mM NAD⁺, 120 U mL⁻¹ glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* and 60 mM ATP); phosphofructokinase-1 (150 mM MgCl₂, 750 mM KCl, 60 mM ATP, 3 mM NADH, 50 U mL⁻¹ aldolase, 112.5 U mL⁻¹ triose phosphate isomerase, 37.5 U/mL α-glycerophosphate dehydrogenase and 150 mM fructose-6-phosphate); pyruvate kinase (150 mM MgCl₂, 750 mM KCl, 37.5 mM ADP, 3 mM NADH, 1500 U mL⁻¹ lactate dehydrogenase and 5 mM phosphoenolpyruvate); lactate dehydrogenase (7.7 mM pyruvate and 3 mM NADH); citrate synthase (2.3 mM acetylcoenzyme A, 3.5 mM DTNB and 3.5 mM oxaloacetate).

Total protein concentration in the homogenates was determined based on the sample absorbance at 550 nm. Measurements were performed using a commercial reagent kit (Bradford Reagent, Sigma-Aldrich, USA) based on the Bradford method.

Data presentation and statistical analysis

Enzyme activity data were expressed as mean \pm SD ($n = 4$). Assumptions of homogeneity of variance and normality of data were tested via Shapiro-Wilk and Bartlett's test, respectively. Enzyme activity after hydrocoral acclimation to the mesocosm conditions and after exposure to the experimental treatments for 16-d and 30-d were compared by two-way (exposure time and pH treatment) analysis of variance (ANOVA). Tukey's test was then used to identify significant differences among experimental treatments. The significance level was set at $p < 0.05$.

Results and discussion

Data showed that the pH treatments were maintained satisfactorily throughout the experimental period, noting that the pH of the acidification levels varied with pH control and varied with the natural diel fluctuations observed in sea water (Duarte et al. 2015; Sarmiento et al. 2015). The $p\text{CO}_2$ values were 351.8 (pH 8.1), 939.0 (pH 7.8), 1683.4 (pH 7.5) and 3494.3 μatm (pH 7.2) (Sarmiento et al. 2015). Data on the other physicochemical parameters monitored in sea water over the course of the experiment were previously reported by Sarmiento et al. (2015).

In hydrocorals kept at the control sea water pH, no significant differences ($p > 0.05$) were observed among the mean activity of hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase, lactate dehydrogenase and citrate synthase over the experimental period. Additionally, no significant differences were observed among the experimental treatments (pH 7.8, 7.5, 7.2) in relation to their respective control (pH 8.1) over the experimental time (Table 1). The samples displayed an inherent variability in the number of samples ($n = 4$). It should be noted that the enzymatic activities were

analyzed without separating the coral fraction from the *Symbiodinium* fraction, therefore representing the entire holobiont.

The enzymes examined in the present study catalyze irreversible reactions, are highly regulated and responsible for the control of the activity of major metabolic pathways (Nelson and Cox 2008). Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase regulate the first, third and tenth steps of glycolysis, respectively. Two molecules of ATP and two molecules of pyruvate are produced from one glucose molecule at the end of this pathway. Under anaerobic conditions, pyruvate is converted into lactate by lactate dehydrogenase, but under aerobic conditions, each molecule of pyruvate is oxidized to acetyl-coenzyme A, which enters the Krebs cycle. In this pathway, citrate synthase catalyzes the initial reaction to form citrate and subsequent production of ATP, NADH and FADH₂ throughout the cycle. These reduced coenzymes are used by the electron transport chain to produce ATP through oxidative phosphorylation (Nelson and Cox 2008).

Considering this background, we observed that the activity of enzymes involved in energy metabolism of *M. alcicornis* did not vary under different levels of decreasing pH, demonstrating that this hydrocoral was able to maintain a steady-state metabolism in aerobic energy production for 30-d of exposure to acidification conditions.

Vidal-Dupiol et al. (2013) observed that after exposing *Pocillopora damicornis* at different pH treatments (8.1, 7.8, 7.4 and 7.2) for 21-d, genes involved in glycolysis and Krebs cycle were up-regulated at pH levels of 7.4 and 7.2, suggesting an increase in energy requirements. However, Kaniewska et al. (2012) observed that the genes involved in the Krebs cycle were down-regulated at pH of 7.8-7.9 and 7.6-7.7 in *Acropora millepora* exposed to three pH levels (8.0-8.02, 7.8-7.9 and 7.6-7.7) for 28-d,

indicating a reduction in capacity to generate ATP. These results do not corroborate with the present study, as enzyme activities associated with energy metabolism in *M. alcicornis* did not vary, suggesting that ATP production remained constant throughout the experiment. Similar results regarding the capacity of *M. alcicornis* to cope with OA were reported by Marangoni et al. (2016b). Specifically, Marangoni et al. (2016b) used the same samples as the present study to evaluate the effect of OA on the calcification rate and the activity of Ca-ATPase and carbonic anhydrase in *M. alcicornis*. They observed that calcification was not affected at pH 8.1-7.5. Furthermore, in corals exposed to pH 7.2 the activity of Ca-ATPase and carbonic anhydrase increased significantly, but the calcification rate significantly decreased. The increased activity of these enzymes involved in calcification did not compensate for the negative effects of OA on the calcareous skeleton of the hydrocoral. These results demonstrate that *M. alcicornis* was able to increase the activity of enzymes without increasing energy costs, as observed in the present results; only this did not mitigate the effects of environmental acidification on calcareous skeleton of this hydrocoral.

Brown and Edmunds (2016) evaluated the effects of OA on calcification in three scleractinian corals: *Porites* spp., *Acropora pulchra* and *Pocillopora meandrina* and hydrocoral *Millepora platyphylla* after 19-d of incubation under orthogonal contrasts of pH 8.1-7.7 and 28.0- 30.1°C. The authors found that only *P. meandrina* was significantly affected at pH 7.7 and 30.1°C. In turn, *M. platyphylla* suffered no negative effects regarding calcification and its biomass was not affected at pH 7.7 and 30.1°C, unlike the scleractinian coral, indicating that acidification responses are taxon-specific and response mechanisms may be related to the phylogeny of the groups assessed. Indeed, several studies recognize that the response of organisms to the effects of

acidification is not homogeneous between species, or with respect to the exposure time and the methodology applied (Kroeker et al. 2013; Edmunds and Wall, 2014; Kaniewska et al. 2015).

It is possible that the 30-d period applied in the present study was not sufficient to observe any significant changes in the energy metabolism of *M. alcicornis* particularly at the lower pH (7.2). Even though Marangoni et al. (2016b) found significant effects on calcification at this pH level at 30-d, they were not associated with a decline in energy production as indicated by our results.

In summary, the present results provide evidence as to how *M. alcicornis* responds biochemically to decreases in environmental pH. These results suggest that this hydrocoral is able to maintain a constant rate of energy production over a wide pH range (8.1-7.2). Further studies that would engage biochemical responses and observe differences at the transcriptomic level of energy metabolism in calcifying organisms are encouraged. This would improve current understanding of how natural marine systems can modulate ocean acidification.

Acknowledgments

The International Development Research Centre (IDRC, Ottawa, Canada; grant # 104519-003), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – Programa Ciências do Mar, Brasília, DF, Brazil; grant # 84/2010) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Toxicologia Aquática, Brasília, DF, Brazil; grant # 573949/2008-5) are acknowledged for their financial support. The authors would like to thank the ‘Rede de Pesquisas Coral Vivo’, Petrobras and the Arraial d’Ajuda Eco

Parque, for all logistical assistance provided. A. Bianchini (Proc. # 304430/2009-9) and C.B. Castro (Proc. #303970/2010-3) are research fellows from the Brazilian CNPq. A. Bianchini is supported by the International Canada Research Chair Program (IDRC). M.M.Lauer is a postdoctoral fellow from the Brazilian Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). AC Jesulich gratefully acknowledges to Scholarship Organization of American States (OAS) and PAEC-OEA-GCUB 2013 program. The authors are grateful to the reviewers for their incisive and helpful comments regarding the manuscript and to Andrew Taylor for English revision.

References

- Bhadury, P (2015) Effects of ocean acidification on marine invertebrates - a review. *Indian J Mar Sci* 44: 1-11
- Brown D, Edmunds PJ (2016) Differences in the responses of three scleractinians and the hydrocoral *Millepora platyphylla* to ocean acidification. *Mar Biol* 163:1-10
- Caldeira K, Wickett M (2005) Ocean model predictions of chemistry changes from carbon dioxide emissions to the atmosphere and ocean. *J Geophys Res* 110: 1-12
- Duarte G, Calderon EN, Pereira CM, Marangoni LFB, Santos HF, Peixoto RS, Bianchini A, Castro CB (2015) A novel marine mesocosm facility to study global warming, water quality, and ocean acidification. *Ecol Evol* 1-12
- Edmunds PJ, Wall CB (2014) Evidence that high pCO₂ affects protein metabolism in tropical reef corals. *Biol Bull* 227: 68-77
- Gattuso, JP (2015) A short summary of the current knowledge on ocean acidification. In: Hilmi N, Allemand D, Kavanagh C, Laffoley D, Metian M, Osborn D, Reynaud S (eds) Bridging the gap between ocean acidification impacts and economic valuation: regional impacts of ocean acidification on fisheries and aquaculture. Gland, Suíça: IUCN, p 136
- Holcomb M, Venn AA, Tambutté E, Tambutté S, Allemand D, Trotter J, Mcculloch M (2014) Coral calcifying fluid pH dictates response to ocean acidification. *Sci Rep* 4: 1-4
- IPCC (2014) Climate Change 2014: Synthesis Report. In: Pachauri RK, Meyer LA (eds) Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, Core Writing Team, Geneva, Suíça, 151 p
- Kaniewska P, Chan C-KK, Kline D, Ling EYS, Rosic N, Edwards D (2015) Transcriptomic changes in coral holobionts provide insights into physiological challenges of future climate and ocean change. *PLoS One* 10: 1-30

- Kaniewska P, Campbell PR, Kline DI, Rodriguez-Lanetty M, Miller DJ (2012) Major cellular and physiological impacts of ocean acidification on a reef building coral. *PloS One* 7: 1-12
- Kroeker KJ, Kordas LR, Crim R, Hendriks IE, Ramajo R, Singh GS, Duarte CM, Gattuso JP (2013) Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global Change Biol* 19: 1884-1896
- Lallier FH, Walsh PJ (1991) Metabolic potential in tissues of the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Bull Mar Sci* 48: 665-669
- Lauer MM, Oliveira CB, Yano NLI, Bianchini A (2012) Copper effects on key metabolic enzymes and mitochondrial membrane potential in gills of the estuarine crab *Neohelice granulata* at different salinities. *Comp Biochem Physiol C*, 156: 140-147
- Lewis JB (2006) The Biology and Ecology of the hydrocoral *Millepora* on coral reefs. *Adv Mar Biol* 50: 1-55
- Marangoni LFB, Marques JA, Bianchini A (2016a) Fisiologia de corais: a simbiose coral-zooxantela, o fenômeno de branqueamento e o processo de calcificação. In: Zilberberg C, Pinto A, Marques JA, Feitosa L, Marangoni L (eds) *Conhecendo os recifes brasileiros*. Rede de Pesquisas Coral Vivo. Série Livros 58, Museu Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, p 364
- Marangoni LFB, Calderon EM, Marques JÁ, Duarte GAS, Pereira CM, Castro CB, Bianchini A (2016b) Effects of CO₂-driven acidification of sea water on the calcification process in the calcareous hydrozoan *Millepora alcicornis* (Linnaeus, 1758). *Coral Reefs*, submitted.
- Nelson DL, Cox MM (2008) *Lehninger: Principles of biochemistry*. W. H. Freeman and company, New York, United States, p 1274
- Sarmento VC, Souza TP, Esteves AM and Santos PJP (2015) Effects of seawater acidification on a coral reef meiofauna community. *Coral Reefs*, 34: 955-966
- Venn AA (2014) The role of pH regulation in coral symbiosis and biomineralization. 4th Coral Reef Ecology Symposium. Available in: <http://coresymposium.wordpress.com/>. Accessed on December 7, 2015.
- Vidal-Dupiol J, Zoccola D, Tambutté E, Grunau C, Cosseau C (2013) Genes related to ion-transport and energy production are upregulated in response to CO₂-driven pH decrease in corals: new insights from transcriptome analysis. *PloS One* 8: 1-11.

Table 1. Activities of key enzymes involved in energy metabolism in the hydrocoral *Millepora alcicornis* after 20-d of acclimation (0 d) and 16-d and 30-d of exposure to four treatments of sea water pH. No significant ($p > 0.05$) differences over the experimental period were observed among hydrocorals kept under control condition (pH 8.1). Also, no significant ($p > 0.05$) differences were observed among sea water pH treatments.

Enzyme	pH	Time (d)		
		0	16	30
Hexokinase (U g prot ⁻¹)	8.1	26 ± 4	24 ± 7	15 ± 3
	7.8		20 ± 4	11 ± 3
	7.5		25 ± 7	12 ± 3
	7.2		24 ± 10	12 ± 3
Phosphofructokinase (U g prot ⁻¹)	8.1	1.62 ± 0.45	2.41 ± 0.25	2.45 ± 0.66
	7.8		2.06 ± 0.29	3.14 ± 0.57
	7.5		1.96 ± 0.21	2.40 ± 0.76
	7.2		2.13 ± 0.27	2.19 ± 1.02
Pyruvate kinase (U g prot ⁻¹)	8.1	396 ± 37	342 ± 40	303 ± 49
	7.8		294 ± 25	252 ± 31
	7.5		282 ± 36	241 ± 67
	7.2		265 ± 43	264 ± 73
Lactate dehydrogenase (U g prot ⁻¹)	8.1	223 ± 49	220 ± 62	216 ± 76
	7.8		185 ± 12	175 ± 30
	7.5		255 ± 65	127 ± 52
	7.2		236 ± 73	215 ± 76
Citrate synthase (U g prot ⁻¹)	8.1	71 ± 16	54 ± 4	43 ± 16
	7.8		54 ± 4	26 ± 6
	7.5		55 ± 11	35 ± 13
	7.2		64 ± 3	42 ± 5

Values: mean ± SD