

**ÍCARO GOMES ANTONIO**

**EFEITOS DA SALINIDADE E DENSIDADE DE ESTOCAGEM NO  
CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA LARVAL DA OSTRÁ DO  
MANGUE *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) SOB DIFERENTES  
TEMPOS DE TROCA DE ÁGUA**

**RECIFE - PE  
2007**

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE PESCA E AQUICULTURA  
PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS PESQUEIROS E AQUICULTURA

**EFEITOS DA SALINIDADE E DENSIDADE DE ESTOCAGEM NO  
CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA LARVAL DA OSTRA DO  
MANGUE *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) SOB DIFERENTES  
TEMPOS DE TROCA DE ÁGUA**

**ÍCARO GOMES ANTONIO**

Dissertação apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Pesqueiros e Aquicultura** da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do grau de **Mestre em Recursos Pesqueiros e Aquicultura**.

**ORIENTADOR: Dr. Alfredo Olivera Gálvez**  
Depto. de Pesca e Aquicultura, UFRPE.

Ficha catalográfica  
Setor de Processos Técnicos da Biblioteca Central – UFRPE

A635e Antonio, Ícaro Gomes  
Efeitos da salinidade e densidade de estocagem no crescimento e sobrevivência larval da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) sob diferentes tempos de troca de água / Ícaro Gomes Antonio. -- 2007.  
50 f. : il.

Orientador : Alfredo Olivera Gálvez  
Dissertação (Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aqüicultura) – Universidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de Pesca e Aqüicultura.  
Inclui anexo e bibliografia

CDD 639.41

1. *Crassostrea rhizophorae*
2. Larvicultura
3. Salinidade
4. Densidade
5. Troca d'água
- I. Olivera Gálvez, Alfredo
- II. Título

Parecer da comissão examinadora da defesa de dissertação de mestrado de

**ÍCARO GOMES ANTONIO.**

**EFEITOS DA SALINIDADE E DENSIDADE DE ESTOCAGEM NO  
CRESCIMENTO E SOBREVIVÊNCIA LARVAL DA OSTRÁ DO  
MANGUE *Crassostrea rhizophorae* (GUILDING, 1828) SOB DIFERENTES  
TEMPOS DE TROCA DE ÁGUA**

Área de concentração: **Aqüicultura**

A comissão examinadora, composta pelos professores abaixo, sob a presidência do orientador, considera o candidato **ÍCARO GOMES ANTONIO** como aprovado com distinção.

Recife, 23 de Fevereiro de 2007.

---

Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez (UFRPE)  
**ORIENTADOR**

---

Prof. Dr. Sílvio Peixoto (UFRPE)  
**Membro interno**

---

Prof. Dr. Gilberto Manzoni (UNIVALI)  
**Membro externo**

---

Prof. Dr. José Carlos Nascimento de Barros (UFRPE)  
**Membro externo**

---

Dr<sup>a</sup>. Roberta Borda Soares (UFRPE)  
**Membro suplente**

*Dedico este trabalho  
as duas pessoas mais importantes da minha vida:  
minha filha LARA e minha esposa MARINA.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, em especial ao Departamento de Pesca e Aqüicultura (DEPAq), pelo apoio na minha graduação e pós graduação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Alfredo Olivera Gálvez, por todo esse período de acompanhamento e ensinamentos.

Aos membros da banca examinadora Dr. Sílvio Peixoto, Dr. Gilberto Manzoni, Dr. José Carlos Nascimento Barros e Dra. Roberta Soares, por terem aceito o convite para comporem a minha banca.

Aos colegas do Laboratório de Maricultura Sustentável (LAMARSU), Irã, Ricardo, André, Henrique, Leônidas, Joana e Ivan pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), Danieli, Weruska, Roberta, Gláucia, Antony e Bruna pela produção das microalgas utilizadas nos experimentos.

Aos colegas Izabel, Marília, Neto, e Wanessa contemporâneos do mestrado, pela amizade e conversas em geral.

Aos meus pais Selma e Sérgio e ao meu irmão Israel, pelo grande apoio, mesmo à distância.

À minha esposa, Marina, por estar comigo e me apoiar por todo este período e a minha filha Lara, razão pela qual sempre me esforço em melhorar.

A todos aqueles, que não citei, mas me apoiaram nessa caminhada e difícil fase da minha vida.

À Deus, por me acompanhar, dando-me saúde e paz, e deixando o resto por minha conta.

# SUMÁRIO

**LISTA DE FIGURAS**

**LISTA DE TABELAS**

**RESUMO**

**ABSTRACT**

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
<b>2.1. Geral.....</b>	<b>13</b>
<b>2.2. Específicos.....</b>	<b>13</b>
<b>3. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>14</b>
<b>3.1. Salinidade.....</b>	<b>14</b>
<b>3.2. Densidade de estocagem.....</b>	<b>15</b>
<b>3.3. Troca de água.....</b>	<b>16</b>
<b>4. ARTIGO CIENTÍFICO: Efeitos da salinidade e densidade de estocagem no crescimento e sobrevivência larval da ostra do mangue <i>Crassostrea rhizophorae</i> (Guilding, 1828) sob diferentes tempos de troca de água.....</b>	<b>17</b>
<b>5. COMENTÁRIOS FINAIS.....</b>	<b>37</b>
<b>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>38</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>45</b>
<b>7.1. Normas para publicação no periódico AQUACULTURE RESEARCH.....</b>	<b>45</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Superfície de resposta do comprimento (A) e altura (B) ( $\mu\text{m}$ ) das larvas de <i>C. rhizophorae</i> ao 6º dia, cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h).....	25
<b>Figura 2:</b> Superfície de resposta da sobrevivência (%) das larvas de <i>C. rhizophorae</i> ao 6º dia, cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h).....	26
<b>Figura 3:</b> Crescimento médio em comprimento e altura ( $\mu\text{m}$ ) e respectivo desvio padrão das larvas de <i>C. rhizophorae</i> , obtido no 14º dia de cultivo nas combinações testadas de salinidade (25 e 35), densidade (3, 6 e 12 larvas.mL <sup>-1</sup> ) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h). Tamanho médio inicial das larvas de 25 de $82,44 \pm 4,67$ e $82,13 \pm 6,77 \mu\text{m}$ e 35 de $78,89 \pm 3,31$ e $74,91 \pm 4,49 \mu\text{m}$ , comprimento e altura, respectivamente.....	27
<b>Figura 4:</b> Superfície de resposta dos percentuais de crescimento (%) do comprimento (A) e altura (B) das larvas de <i>C. rhizophorae</i> ao 14º dia, cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h).....	29
<b>Figura 5:</b> Superfície de resposta da sobrevivência (%) das larvas de <i>C. rhizophorae</i> ao 14º dia, cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h) (A) e densidade de estocagem (2, 4 e 8 larvas.mL <sup>-1</sup> ) e troca de água (24, 48 e 72h) (B).....	30



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Valores médios e respectivos desvios padrões do comprimento, altura e sobrevivência das larvas de <i>C. rhizophorae</i> obtidos no 6º dia de cultivo nas combinações testadas de salinidade (25 e 35), densidade (3, 6 e 12 larvas.mL <sup>-1</sup> ) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h), classificados segundo o teste SNK.....	24
<b>Tabela 2:</b> Valores médios e respectivos desvios padrões dos percentuais de crescimento (PC) do comprimento e altura e da sobrevivência das larvas de <i>C. rhizophorae</i> obtidos no 14º dia de cultivo nas combinações testadas de salinidade (25 e 35), densidade (2, 4 e 8 larvas.mL <sup>-1</sup> ) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h), classificados segundo o teste SNK.....	28

## RESUMO

O efeito conjunto da salinidade, densidade de estocagem e tempo de troca de água no crescimento e sobrevivência larval da *Crassostrea rhizophorae* foram estudados em dois experimentos correspondentes ao período do 1º ao 6º dia (experimento 1) e 7º ao 14º dia (experimento 2) depois da formação da larva D-véliger. Duas salinidades (25 e 35) e três densidades (3, 6 e 12 larvas.mL<sup>-1</sup> – experimento 1) e (2, 4 e 8 larvas.mL<sup>-1</sup> – experimento 2) foram testadas sob três tempos de troca de água (24, 48 e 72h). Diagramas de superfície de resposta foram gerados para os dados de sobrevivência e crescimento larval para estimação das condições ótimas. A salinidade acima de 32,5 proporcionou a maior sobrevivência larval na primeira semana ( $\geq 50\%$ ), mas esta não foi diferente da faixa salina entre 25 e 31 com trocas de água acima de 70h. Entre o 7º e o 14º dia de larvicultura a sobrevivência foi maior em salinidades inferiores a 26 ( $\geq 14\%$ ). O crescimento foi superior nos dois experimentos em salinidades abaixo de 27. Trocas de água superiores a 36h aumentaram o crescimento e sobrevivência larval nos dois experimentos. Todas as densidades utilizadas em ambos experimentos não foram diferentes estatisticamente para o crescimento ( $P>0,05$ ). No entanto, a sobrevivência foi maior no experimento 1 nas densidades de 6 (32,56%) e 12 larvas.mL<sup>-1</sup> (37,1%) e no segundo todas as densidades foram estatisticamente iguais. Baseado nos resultados deste estudo é recomendado que as larvas de *C. rhizophorae* sejam cultivadas em salinidades inferiores a 27 e trocas de água acima de 36h com densidades de 12 larvas mL<sup>-1</sup> e 8 larvas mL<sup>-1</sup>, primeira e segunda semana respectivamente.

## ABSTRACT

The combined effects of salinity, stocking density and time of water exchange on the growth and survival of *Crassostrea rhizophorae* larvae were studied in two experiments from 1<sup>st</sup> to 6<sup>th</sup> day (experiment 1) and 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day (experiment 2) after larvae D-veliger formation. Two salinities (25 and 35) and three densities (3, 6 and 12 larvae.mL<sup>-1</sup> – experiment 1) and (2, 4 and 8 larvae.mL<sup>-1</sup> – experiment 2) were tested at three times of water exchange (24, 48 and 72h). Response surface diagrams were generated for the survival and growth data to estimate optimal conditions. Salinities over 32.5 had the highest survival in the first week, but it was not different from the salinity under 26 with water exchanges over 70h ( $\geq 50\%$ ). Between the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of larval rearing, survival was highest in  $\leq 26$  of salinity ( $\geq 14\%$ ). Growth was higher in both experiments with the salinities under 27. Water exchanges higher than 36h improved growth and survival in both experiments. All the densities used in both experiments did not differ significantly for growth ( $P>0.05$ ). Although, the survival was highest in experiment 1 in the densities of 6 (32.56%) and 12 (37.1%) larvae.mL<sup>-1</sup> and in the second week there was no statistical difference among the densities used. The results indicate that, to maximize growth and survival, *C. rhizophorae* larvae should be cultured at salinities below 27 and water exchanges over 36h with densities of 12 larvae mL<sup>-1</sup> and 8 larvae mL<sup>-1</sup>, first and second week respectively.

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a FAO, a contribuição da aquicultura ao fornecimento global de peixes, crustáceos, moluscos e macroalgas continua a crescer mais rápido que todos os outros setores produtores de alimentos. Em todo o mundo, desde 1970, a aquicultura tem crescido numa média de 8,9% ao ano, comparado com somente 1,2% das capturas e 2,8% dos outros sistemas de produção de alimentos (FAO, 2004).

A produção mundial através da aquicultura no ano de 2004 foi de 59,4 milhões de toneladas e o Brasil apresentou uma produção de 269.699 t. Durante o período de 1994-2004, a captura mundial de moluscos bivalves cresceu somente 10,1%, enquanto que as operações de cultivo cresceram 94,5% (FAOa, 2006).

O cultivo de moluscos é uma área dentro da aquicultura mundial que vem se expandindo rapidamente, representando 22,3% dos rendimentos do setor com 13,2 milhões de toneladas em 2004 (FAOb, 2006). Neste mesmo ano, o organismo que apresentou a maior produção individual dentre todos as espécies cultivadas foi a ostra do pacífico *Crassostrea gigas*, com 4,4 milhões de toneladas. No Brasil a produção de moluscos em 2004 foi de 13.063 t, tendo o mexilhão *Perna perna* como o seu principal produto (10.380 t) (FAOa, 2006).

As pesquisas de cultivo de moluscos (ostras ou mexilhões) no Brasil foram iniciadas na década de setenta, quase que simultaneamente em diversos Estados do Brasil, apesar de não ter existido nenhum Programa Nacional de Desenvolvimento de Cultivo de Moluscos. Tais resultados nos estudos da bioecologia destes organismos foram obtidos de esforços isolados de grupos de pesquisas, os quais foram influenciados por experiências estrangeiras, que viram nesta atividade uma alternativa para a pesca artesanal, como também para a manutenção dos estoques explorados pelas populações ribeirinhas (UFSC, 1997).

Em relação ao cultivo da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae*, as experiências realizadas pelo Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia (UFBA), através de um convênio de cooperação técnica com o Conselho Britânico, foram as precursoras desta atividade, quando em 1972, iniciaram um projeto de cultivo denominado Bioecologia da Ostra - Jiribatuba – Canal de Itaparica, BA. Outros trabalhos foram realizados com a mesma espécie nos estados de Santa Catarina, Ceará, Paraná e Pernambuco (UFSC, 1997.). Todos os cultivos de ostra nativa realizados nessa época foram com a utilização de sementes oriundas da captação no meio natural (POLI, 1994).

A necessidade de tecnologia de cultivo larval no Brasil surgiu com o crescimento da ostreicultura na década de 1970, que associado ao baixo desenvolvimento de estoques naturais

nos países onde a *C. gigas* foi introduzida, levou a uma alta demanda de sementes provenientes do Japão com conseqüente elevação no preço e limite no suprimento destas (DONALDSON, 1991).

Em 1974, foi introduzida a *C. gigas* no Brasil pelo Instituto de Pesquisa da Marinha do Cabo Frio/RJ, com sementes trazidas da Grã-Bretanha (MUNIZ, 1983), ocorrendo posteriormente, em 1975, outra entrada de sementes do "Oyster Research Institute of Sendai" (Japão) para o Instituto de Pesca de São Paulo (AKABOSHI et al., 1979). Em 1981, o Instituto de Biologia da Universidade Federal da Bahia, importou sementes do "Ministry of Agriculture Fisheries and Food, Fisheries Experiment Station, Conway, North Wales" (RAMOS et al., 1986).

A utilização da *C. gigas* como a espécie principal da ostreicultura brasileira foi justificada pelo rápido crescimento da espécie, facilidade de adaptação, bom rendimento de carne e um amplo conhecimento biológico mundialmente disponível (AKABOSHI et al., 1983).

Atualmente, a maioria dos cultivos de moluscos bivalves no mundo obtém suas sementes através da coleta no ambiente natural ou também da coleta de juvenis em áreas que apresentem grande abundância. Porém, em outros locais de cultivo, as áreas de coleta não existem ou quando existem elas não conseguem suprir a demanda de sementes, ou somente apresentam disponibilidade de sementes de forma sazonal. Uma solução para os requerimentos de sementes de moluscos bivalves, aplicável a uma produção das espécies de maior valor comercial como as almejas, ostras e vieiras, é a produção em laboratório. Esta atividade apresenta grandes vantagens sobre a coleta em ambiente natural, pois essas sementes são provenientes de reprodutores conhecidos, apresentam uma uniformidade no tamanho e podem suprir as necessidades dos produtores quando for necessário. Esse tipo de produção pode garantir o suprimento de sementes que não são disponíveis aos produtores em bancos naturais, por exemplo, linhagens melhoradas geneticamente ou sementes de espécies exóticas (HELM et al., 2004).

O custo de produção é a principal desvantagem de produzir sementes em laboratório, porém devido aos melhoramentos tecnológicos terem atualmente aumentado a confiança e viabilidade financeira, se torna possível produzir sementes a preços competitivos. Em algumas partes do mundo, os laboratórios são a única fonte de produção de sementes para os cultivos comerciais, porém existe ainda uma grande necessidade de fazer com que eles se tornem mais eficientes e amplamente aceitos como a fonte principal de sementes (HELM et al., 2004).

A produção nacional de sementes de moluscos bivalves, atualmente, resume-se às regiões Sul e Sudeste, produzindo basicamente duas espécies, a *C. gigas* e a vieira *Nodipecten nodosus*. A região Sul está representada pelo Laboratório de Moluscos Marinhos da Universidade Federal de Santa Catarina e pelo Laboratório de Pesquisa de Moluscos da Universidade do Vale do Itajaí, situados em Santa Catarina e o Centro de Propagação de Organismos Marinhos (CPPOM), no Paraná. Na região Sudeste, há apenas um laboratório, o Instituto de Ecodesenvolvimento da Baía de Ilha Grande (IED – BIG), situado em Angra dos Reis – RJ. Estas unidades de produção não conseguem atender à demanda crescente nestas regiões e esporadicamente os produtores têm que importar sementes e/ou “larvas olhadas” de outros países como o Chile e os E.U.A (ANTONIO, 2004).

A *C. rhizophorae* por ser uma espécie que apresenta uma grande distribuição geográfica, indo desde o Mar do Caribe até o estado de Santa Catarina no Brasil, apresenta poucas pesquisas sobre seus requerimentos, bem como os principais fatores que afetam a sua produção em laboratório.

Com a construção do primeiro laboratório de produção de sementes de ostra do mangue na região Nordeste, mais especificamente em Recife-PE, tem-se a possibilidade de realizar uma série de pesquisas básicas, como forma de estudar detalhadamente os aspectos biológicos e genéticos. Estes estudos servirão como base para definir os valores ótimos das principais variáveis, que façam com que haja um melhor desempenho e melhores resultados na produção desta espécie no Nordeste brasileiro, mais precisamente no estado de Pernambuco.

Essa produção de sementes na região Nordeste permitirá ao setor produtivo, a obtenção de sementes com o conhecimento da procedência, diferentemente das obtidas com coletores e também contribuir para que o Nordeste torne-se outro pólo de produção de moluscos no Brasil.

O sucesso da produção de larvas de ostras em laboratório é basicamente dependente da habilidade em manipular e controlar o ambiente de cultivo (DEVAKIE & ALI, 2000). Desta forma o presente trabalho tem como objetivo a determinação dos efeitos dos principais fatores, como salinidade, densidade de estocagem e tempo de troca de água, no desenvolvimento das larvas da ostra do mangue.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Geral**

Comparar o efeito de diferentes condições de cultivo e manejo na larvicultura sobre o crescimento e sobrevivência das larvas de *C. rhizophorae*.

### **2.2. Específicos**

- Comparar o efeito de diferentes salinidades sobre o crescimento e sobrevivência de larvas da ostra do mangue em laboratório.
- Comparar o efeito de diferentes densidades de cultivo sobre o crescimento e sobrevivência de larvas nos estágios de D-véliger e umbo-véliger da ostra do mangue em laboratório;
- Comparar o efeito do tempo de troca de água sobre o crescimento e sobrevivência de larvas da ostra do mangue em laboratório;
- Comparar o efeito das interações de salinidade, densidade e troca de água no crescimento e sobrevivência larval da ostra do mangue em laboratório;
- Determinar em que combinação de salinidade, densidade de estocagem e troca de água ocorre o melhor crescimento e sobrevivência larval da *C. rhizophorae*.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1. Salinidade

Estudos auto-ecológicos em bivalves tem claramente demonstrado que o desenvolvimento, crescimento e sobrevivência são afetados por parâmetros físicos, em particular a temperatura e a salinidade, os quais têm sido descritos como “fatores principais” para muitos organismos marinhos (KINNE, 1964).

Salinidade representa um dos fatores ecológicos mais importantes que influencia a biologia de estágios planctônicos de organismos estuarinos, como as ostras. Este fator pode ser facilmente mensurado, manipulado e controlado, comparado com outros fatores (DEVAKIE & ALI, 2000).

Ostras do gênero *Crassostrea* geralmente são consideradas como organismos eurihalinos (QUAYLE & NEWKIRK, 1989). Pesquisadores têm estudado o efeito da salinidade nos padrões de desenvolvimento e crescimento de bivalves na natureza e em laboratório (PAUL, 1980; TETTELBAACH & RHODES, 1981; KALYANASUNDARAM & RAMAMOORTHY, 1986; ROLDÁN-CARRILLO et al., 2005)

A salinidade é um fator ambiental muito importante na determinação da distribuição dos moluscos bivalves (TAYLOR et al., 2004). Mudanças na salinidade podem acarretar diferentes respostas fisiológicas em bivalves, tendo sido observada a influência na taxa de filtração, consumo de oxigênio (BERNARD, 1983) e a taxa de transporte de partículas sobre as brânquias (PAPARO, 1981; PAPARO & DEAN, 1982).

A influência da salinidade no cultivo de muitos bivalves de importância comercial como as vieiras, *Pecten fumatus* (NELL & GIBBS, 1986); *Argopecten irradians* (MERCALDO & RHODES, 1982) e *Argopecten ventricosus* (SIGNORET-BRAILOVSKY et al., 1996); ostras, *Ostrea angasi*, *Saccostrea commercialis* (NELL & GIBBS, 1986); *Ostrea edulis* (CASTAGNA & CHANLEY, 1973), *C. gigas* (HELM & MILLICAN, 1977), e *Crassostrea virginica* (LOOSANOFF & DAVIS, 1963; ANDERSON & ANDERSON, 1975); e mexilhões, *Mytilus edulis* (NELL & GIBBS, 1986) tem sido determinada.

Porém, poucos estudos relativos a influência da salinidade em ostras tropicais como a *C. rhizophorae* (DOS SANTOS & NASCIMENTO, 1985) e a *Crassostrea belcheri* (TAN & WONG, 1996) tem sido realizados.

Coeroli et al. (1984) reportaram que a faixa salina entre 20 e 30 suportou as maiores sobrevivências larvais de *Saccostrea echinata* em experimentos na Polinésia francesa. Larvas de *S. commercialis*, apresentaram as maiores taxas de crescimento entre 23 e 39 e também as



maiores sobrevivências entre 27 e 39 (NELL & HOLLIDAY, 1988). Pesquisa realizada com *C. belcheri*, demonstrou que a maior sobrevivência larval foi verificada entre as salinidades de 12 e 24, e também nessa faixa foi observado maior crescimento a 18 (TAN & WONG, 1996).

Helm e Millican (1977), estudando o desenvolvimento larval de *C. gigas*, encontraram o maior crescimento na salinidade de 25. Sudrajat (1990), estudando as ostras *Crassostrea iredalei* e *Saccostrea cucullata* observou salinidade ótima de 25. Kalyanasundaram & Ramamoorthi (1986), trabalhando com a espécie *S. cucullata*, observaram que a faixa de salinidade que apresentou o melhor desenvolvimento larval era entre 15 e 35.

Com relação ao desenvolvimento larval da *C. rhizophorae*, Dos Santos e Nascimento (1985), verificaram que o melhor resultado estava entre 25 e 37 e Miranda e Guzinski (1999) recomendam as salinidades entre 25 e 30.

### 3.2. Densidade de estocagem

Outros fatores de grande importância para o cultivo larval de ostras são a densidade populacional e a taxa de renovação de água (OLIVEIRA, 1998). Estes fatores e seus efeitos no crescimento e sobrevivência larval têm sido pouco estudados, porém são considerados de grande importância por determinarem a produção do laboratório.

Loosanoff e Davis (1963) estabeleceram os princípios gerais da produção de larvas de moluscos bivalves, porém recomendavam densidades superiores as toleradas por diferentes espécies de moluscos bivalves. Estes autores estudaram o efeito do aumento da densidade em *Mercenaria mercenaria* e *C. virginica* e determinaram que mesmo havendo uma relação inversa entre o crescimento e a densidade de estocagem, a sobrevivência não era afetada. Posteriormente a esses estudos, pouco foi realizado na identificação das densidades ótimas para diferentes espécies de moluscos (IBARRA et al., 1997).

Para a vieira *Pecten maximus*, Gruffydd e Beaumont (1972) testaram densidades larvais de 1,5; 10 e 20 larvas.mL<sup>-1</sup> e concluíram que as duas densidades inferiores resultaram um melhor crescimento. Para *Pecten ziczac*, Rojas et al. (1988) concluíram que a melhor densidade de estocagem foi 5 larvas.mL<sup>-1</sup>, o mesmo resultado encontrado na larvicultura de *C. gigas* em unidades experimentais de 2L nos primeiros 7 dias após a formação da larva D-véliger (PONIS et al., 2003). Brown e Robert (2002) utilizaram uma densidade de 5 larvas/mL em unidades de 20L, durante um experimento com *C. gigas* durante 16 dias.

Em geral, os estudos de larvicultura de moluscos bivalves não levam em consideração a necessidade da diminuição da densidade de estocagem durante o desenvolvimento larval. Wang et al. (1992), testando diferentes densidades no cultivo larval de *Moerella iridescens*,

verificaram essa necessidade, pois as densidades que obtiveram os melhores resultados foram 30 e 10 larvas.mL<sup>-1</sup>, fase D-véliger e umbonada respectivamente.

Existe também uma grande variação na densidade de estocagem usada para uma mesma espécie. Por exemplo, para *C. virginica*, as densidades larvais variam de 10 larvas.mL<sup>-1</sup> (NEWKIRK et al., 1977) a 5 larvas.mL<sup>-1</sup> (MALLET & HALEY, 1983a). Mallet e Haley (1983b) reportam que densidades de 35 a 40 ovos.mL<sup>-1</sup>, apresentaram uma sobrevivência para larvas de dois dias de vida de 23,4 a 58,6%. Para *M. mercenaria*, Rawson e Hilbish (1990) e Hilbish et al. (1993), encontraram melhores resultados na densidade de estocagem de 10 larvas.mL<sup>-1</sup>, enquanto que Hadley et al. (1991) em 5 larvas.mL<sup>-1</sup>.

### **3.3. Troca de água**

Normalmente os laboratórios de produção de sementes de moluscos bivalves realizam o cultivo larval em sistema estático, ou seja, a água toda é trocada a cada período de tempo. A cada troca de água, as larvas são drenadas dos tanques de cultivo através de peneiras e retornam para uma nova água em um tanque limpo (SOUTHGATE e ITO, 1998).

Durante cada troca de água, normalmente as larvas são analisadas no que se refere a locomoção, presença de anormalidades no véluo, coloração e sobrevivência.

A determinação do tempo de troca de água depende de cada laboratório e do técnico responsável, porém Helm e Millican (1977) verificaram que trocas de água mais frequentes que 48h afetavam o crescimento larval. A partir desta observação, trocas de água a cada 48h (IBARRA et al, 1997; LABARTA et al., 1999; DOROUDI & SOUTHGATE, 2000; PONIS et al., 2003a,b) vem sendo mais utilizada nas larviculturas de moluscos bivalves do que trocas diárias (DOROUDI et al., 2002) ou a cada 72h (THOMPSON et al, 1996).

#### **4. ARTIGO CIENTÍFICO**

Artigo a ser submetido para o periódico AQUACULTURE RESEARCH.

1           **Efeitos da salinidade e densidade de estocagem no crescimento e**  
2 **sobrevivência larval da ostra do mangue *Crassostrea rhizophorae* (Guilding,**  
3           **1828) sob diferentes tempos de troca de água**

4  
5  
6           **Effects of salinity and stocking density on larval growth and survival of**  
7 **mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) under different**  
8           **times of water exchange**

9  
10           **Ícaro Gomes Antonio\*, Irã M. Guimarães e Alfredo Olivera**

11  
12           Laboratório de Maricultura Sustentável, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade  
13           Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil.

14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26           **Correspondência postal**

27  
28  
29           \*Laboratório de Maricultura Sustentável, Departamento de Pesca e Aqüicultura, Universidade  
30           Federal Rural de Pernambuco, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE,  
31           Brasil, CEP: 52171-900, Telefone: +55 81 33206504, Fax: +55 81 33206501, E-mail:  
32           icaro\_gomes@hotmail.com

1   **Abstract**

2

3           The combined effects of salinity, stocking density and time of water exchange on the  
4 growth and survival of *Crassostrea rhizophorae* larvae were studied in two experiments from  
5 1<sup>st</sup> to 6<sup>th</sup> day (experiment 1) and 7<sup>th</sup> to 14<sup>th</sup> day (experiment 2) after D-veliger larvae  
6 formation. Two salinities (25 and 35) and three densities (3, 6 and 12 larvae.mL<sup>-1</sup> –  
7 experiment 1) and (2, 4 and 8 larvae.mL<sup>-1</sup> – experiment 2) were tested at three times of water  
8 exchange (24, 48 and 72h). Response surface diagrams were generated for the survival and  
9 growth data to estimate optimal conditions. Salinities over 32.5 had the highest survival in the  
10 first week, but it was not different from the salinity under 26 with water exchanges over 70h  
11 ( $\geq 50\%$ ). Between the 7<sup>th</sup> and 14<sup>th</sup> day of larval rearing, survival was highest in  $\leq 26$  of  
12 salinity ( $\geq 14\%$ ). Growth was higher in both experiments with the salinities under 27. Water  
13 exchanges higher than 36h improved growth and survival in both experiments. All the  
14 densities used in both experiments did not differ significantly for growth ( $P>0.05$ ). Although,  
15 the survival was highest in experiment 1 in the densities of 6 (32.56%) and 12 (37.1%)  
16 larvae.mL<sup>-1</sup> and in the second week there was no statistical difference among the densities  
17 used. The results indicate that, to maximize growth and survival, *C. rhizophorae* larvae should  
18 be cultured at salinities below 27 and water exchanges over 36h with densities of 12 larvae  
19 mL<sup>-1</sup> and 8 larvae mL<sup>-1</sup>, first and second week respectively.

20

21

22

23

24

25

26   **Keywords:** *Crassostrea rhizophorae*, larval rearing, salinity, density, water exchange.

27

28

## 1 **1. Introdução**

2 A ostra do mangue, *Crassostrea rhizophorae*, é uma espécie importante para a  
3 exploração comercial ao longo da costa brasileira, principalmente para a região Nordeste do  
4 Brasil. Extensivos bancos naturais, especialmente próximos a áreas urbanas, estão sendo  
5 sobre explorados, e a produtividade desses locais diminuiu significativamente (Lemos et al.,  
6 1994). O cultivo de ostras oferece uma possível solução para esse declínio, porém a oferta de  
7 sementes visando uma produção comercial, somente poderá ser realizada através da produção  
8 em laboratório, devido a captação natural não conseguir suprir as demandas desse tipo de  
9 empreendimento. Atualmente, poucos estudos relacionados a produção de sementes de *C.*  
10 *rhizophorae* estão sendo realizados no Brasil e ainda não se tem definido um protocolo de  
11 produção para essa espécie.

12 Estudos auto-ecológicos em bivalves tem claramente demonstrado que o  
13 desenvolvimento, crescimento e sobrevivência são afetados por parâmetros físicos, em  
14 particular a salinidade, descrita como um dos fatores principais para muitos organismos  
15 marinhos (Kinne, 1964). A salinidade representa um dos fatores ambientais mais importantes  
16 que influenciam a biologia de estágios planctônicos de organismos estuarinos, como as ostras.  
17 Este fator pode ser facilmente mensurado, manipulado e controlado, comparado com outros  
18 fatores (Devakie & Ali, 2000). Entretanto, poucos estudos relativos à influência da salinidade  
19 sobre o crescimento e sobrevivência larval de ostras tropicais como a *C. rhizophorae* (Dos  
20 Santos & Nascimento, 1985; Lemos et al., 1994; Miranda & Guzenski, 1999) e a *Crassostrea*  
21 *belcheri* (Tan & Wong, 1996) têm sido realizados.

22 Outros fatores de grande importância para o cultivo larval de ostras são a densidade  
23 populacional e a taxa de renovação de água. Estes fatores e seus efeitos no crescimento e  
24 sobrevivência larval têm sido pouco estudados, porém são considerados de grande  
25 importância por determinarem a produção do laboratório (Ibarra et al., 1997).

26 Loosanoff & Davis (1963), estabeleceram os princípios gerais da produção de larvas  
27 de moluscos bivalves, porém recomendavam densidades superiores as toleradas por diferentes  
28 espécies de moluscos bivalves. Estes autores estudaram o efeito do aumento da densidade em  
29 *Mercenaria mercenaria* e *Crassostrea virginica* e determinaram que mesmo havendo uma  
30 relação inversa entre o crescimento e a densidade de estocagem, a sobrevivência não era  
31 afetada. Posteriormente a esses estudos, pouco foi realizado na determinação das densidades  
32 ótimas para diferentes espécies de moluscos (Ibarra et al., 1997).

33 Normalmente os laboratórios de produção de sementes de moluscos bivalves realizam  
34 o cultivo larval em sistema estático, ou seja, toda a água é trocada a cada período de tempo. A

1 cada troca de água, as larvas são drenadas dos tanques de cultivo através de peneiras e  
2 retornam para uma nova água em um tanque limpo (SOUTHGATE e ITO, 1998).

3 A rotina depende de cada laboratório e do técnico responsável, porém Helm e Millican  
4 (1977) verificaram que trocas de água mais frequentes que 48h afetavam o crescimento larval.  
5 A partir desta observação, trocas de água a cada 48h (Ibarra et al, 1997; Labarta et al., 1999;  
6 Doroudi & Southgate, 2000; Ponis et al., 2003a,b) vem sendo mais utilizada nas larviculturas  
7 de moluscos bivalves do que trocas diárias (Doroudi et al., 2002) ou a cada 72h (Thompson et  
8 al., 1996).

9 O presente estudo foi realizado no intuito de identificar a influência conjunta de  
10 salinidade, densidade de estocagem e tempo de troca de água no crescimento e sobrevivência  
11 larval da *C. rhizophorae* durante os primeiros 14 dias de desenvolvimento, utilizando um  
12 desenho fatorial do tipo 2 x 3 x 3. O desenho fatorial proporciona maior precisão para avaliar  
13 as interações entre os diferentes fatores e permite interpolação das interações em níveis  
14 intermediários dos fatores que estão sendo testados (Doroudi et al., 1999).

15

## 16 **2. Material e Métodos**

17 Experimentos para determinar o efeito da salinidade, densidade de estocagem e tempo  
18 de troca de água na larvicultura de *C. rhizophorae* foram realizados no Laboratório de  
19 Maricultura Sustentável, Universidade Federal Rural de Pernambuco (LAMARSU-UFRPE),  
20 Recife, Pernambuco, Brasil. Reprodutores maduros de ostra nativa *C. rhizophorae* foram  
21 coletados do plantel mantido no município de Goiana, Pernambuco, Brasil (7° 40' 32,96"S,  
22 34° 50' 33,95"W) e transferidos para o LAMARSU. Os experimentos foram realizados  
23 durante o mês de setembro de 2006.

24

### 25 *2.1. Desova*

26 A liberação dos gametas foi realizada através de indução térmica, utilizando 100  
27 indivíduos adultos (Breese & Malouf, 1975). Após a liberação dos ovócitos e  
28 espermatozóides foi realizada uma estimativa do número total de gametas e em seguida a  
29 fertilização dos ovócitos. Aproximadamente 12 milhões de ovos foram incubados em uma  
30 densidade de 30 ovos.mL<sup>-1</sup> por 24 horas em um tanque de fibra de vidro com 400 L de água a  
31 25°C e salinidade de 30.

32

33 Após 24h da fertilização, as larvas D-véliger foram coletadas por peneiras de 35µm e  
estimada a sobrevivência através da contagem de três alíquotas de 1 mL. Uma amostra de 40

1 mL foi fixada em solução de 4% de formol para posterior determinação do tamanho inicial  
2 (comprimento e altura) da população, estimada através da medição de 30 larvas.

### 4 2.2. Cultivo larval

5 Larvas véliger foram cultivadas sob 3 sistemas de troca de água: 24, 48 e 72h, dividido  
6 em dois experimentos, referentes aos estágios larvais da ostra nativa *C. rhizophorae*. No  
7 primeiro experimento (1° ao 6° dia - larva D-véliger) foram utilizadas as densidades de 3, 6 e  
8 12 indivíduos.mL<sup>-1</sup> e no segundo experimento (7° ao 14° dia - larva umbonada) utilizou-se as  
9 densidades de 2, 4 e 8 indivíduos.mL<sup>-1</sup>. Além do efeito da densidade de estocagem e troca de  
10 água, foi testado o efeito da salinidade, utilizando os valores de 25 e 35 para ambos estágios  
11 larvais.

12 Dessa forma, cada experimento constou de 18 tratamentos (combinações de 2  
13 salinidades, 3 densidades de estocagem e 3 tempos de troca de água) com 3 repetições cada,  
14 totalizando 54 unidades experimentais.

15 Em ambos os experimentos, as larvas foram cultivadas em recipientes de  
16 polipropileno de 3 L. Toda a água salgada utilizada no laboratório foi filtrada através de  
17 filtros de areia, filtros de cartucho (5 e 3µm), esterilizada através de cloração e passadas em  
18 filtro de carvão ativado. A salinidade de 25 foi alcançada através da diluição de água a 35 em  
19 água doce esterilizada. A aeração suave foi fornecida através de soprador e regulada através  
20 de difusores individuais, mantendo um valor médio de oxigênio dissolvido de  $6,78 \pm 0,16$   
21 mg.L<sup>-1</sup>. A cada troca de água, as larvas eram filtradas em peneiras de 35 e 90µm no primeiro  
22 experimento e 50 e 120µm no segundo. A temperatura média durante os 14 dias de cultivo  
23 larval foi de  $24,86 \pm 0,4^\circ\text{C}$ . Não se utilizou nenhum tipo de antibiótico durante a larvicultura.

24 A alimentação foi ministrada duas vezes ao dia, 40% pela manhã e 60% a tarde após a  
25 troca de água, composta no primeiro experimento de uma dieta a base de 30 células.µL<sup>-1</sup> de  
26 *Thalassiosira pseudonana* e no segundo com uma dieta mista de 35 células.µL<sup>-1</sup> *Chaetoceros*  
27 *muelleri* e 15 células.µL<sup>-1</sup> *T. pseudonana*. As microalgas foram cultivadas em sistema batch  
28 utilizando o meio Conway (Walne, 1964) e foram utilizadas na fase exponencial. Em ambos  
29 os experimentos, as mesmas concentrações de alimento foram utilizadas em todas as unidades  
30 experimentais, não levando em consideração o aumento da densidade de estocagem.

31 As larvas que sobraram após a montagem do experimento 1 foram divididas em dois  
32 tanques de 500 L de fibra de vidro (25 e 35 de salinidade) e mantidas a densidade de 6 mL<sup>-1</sup>,  
33 com troca de água a cada 48h, aeração suave e alimentação igual a do experimento 1, até o  
34 início do segundo experimento.



### 2.3. Variáveis analisadas

Diariamente, pela manhã, foram mensuradas as variáveis temperatura (°C), oxigênio dissolvido ( $\text{mg.L}^{-1}$ ) e em saturação (%), utilizando oxímetro digital (OXI 330 WTW).

Ao final de cada experimento as larvas foram filtradas e fixadas em solução de formalina a 4% em recipientes de 40 mL. A sobrevivência foi estimada como uma porcentagem restante da população inicial.

O crescimento em comprimento (máxima dimensão antero-posterior) e altura (máxima dimensão dorso-ventral) foram dimensionados através da medição de 30 larvas por unidade experimental. Para as medições, as larvas foram colocadas em câmara de Sedgewick-Rafter e algumas imagens das larvas (na resolução: 1280 x 960 pixels) foram tomadas utilizando uma câmera digital acoplada a um microscópio óptico no aumento de 100X. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageTool versão 2.0 para Windows (Universidade do Texas Health Science Center, San Antonio - TX, USA). Para o experimento 2, como as larvas apresentaram um tamanho inicial diferente estatisticamente, foi utilizado o percentual de crescimento (%).

### 2.4. Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com a utilização do programa estatístico Statistica 7.0 (StatSoft Inc., USA). O tamanho amostral (30 larvas) para as medições de crescimento foi definido através do método sugerido por Nomura (1960). Os dados em porcentagem (sobrevivência e percentual de crescimento) passaram por uma transformação angular do tipo arco-seno, porém somente os dados originais são apresentados. A normalidade e a homogeneidade dos dados foram verificadas pelo teste de Kolgomorov-Smirnov e Cochran (Zar, 1984), respectivamente.

Foi utilizada uma ANOVA Multifatorial (2 x 3 x 3) para verificar o efeito da salinidade, densidade, troca de água e suas interações no crescimento (comprimento e altura) e sobrevivência das larvas, através da utilização do seguinte modelo:

$$Y = \mu + A + B + C + AB + BC + ABC + e$$

Nos casos em que foi verificada diferença entre as médias ( $P < 0,05$ ) utilizou-se o teste de separação de médias de Student-Newman-Keuls ( $P = 0,05$ ). Também foi realizada uma interação entre os fatores através da Análise de Regressão Múltipla e posteriormente um confronto das variáveis através dos polinômios ortogonais e superfícies de resposta, utilizando o programa SigmaPlot para Windows versão 10.0 (Systat Software Inc.).

### 3. Resultados

#### 3.1. Experimento 1

O tamanho inicial das larvas foi de  $64,42 \pm 2,78$  e  $56,71 \pm 2,98$   $\mu\text{m}$ , para comprimento e altura, respectivamente. Os dados médios de crescimento e sobrevivência larval no 6º dia, cultivadas sob duas salinidades, três densidades de estocagem e três tempos de troca de águas são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores médios e respectivos desvios padrões do comprimento, altura e sobrevivência das larvas de *C. rhizophorae* obtidos no 6º dia de cultivo nas combinações testadas de salinidade (25 e 35), densidade (3, 6 e 12 larvas.mL<sup>-1</sup>) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h), classificados segundo o teste SNK.

Combinações (salinidade/ larvas.mL <sup>-1</sup> /h)	Comprimento ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=90)	Altura ( $\mu\text{m}$ ) $\pm$ desvio padrão (n=90)	Sobrevivência (%) $\pm$ desvio padrão
25/3/24	74,68 $\pm$ 6,04 <sup>abcd</sup>	74,40 $\pm$ 7,07 <sup>bc</sup>	3,26 $\pm$ 0,64 <sup>ab</sup>
25/3/48	79,02 $\pm$ 5,48 <sup>d</sup>	75,26 $\pm$ 6,25 <sup>c</sup>	11,61 $\pm$ 0,92 <sup>bc</sup>
25/3/72	77,66 $\pm$ 4,78 <sup>cd</sup>	74,94 $\pm$ 5,35 <sup>bc</sup>	47,31 $\pm$ 15,77 <sup>fg</sup>
25/6/24	76,91 $\pm$ 5,19 <sup>abcd</sup>	72,68 $\pm$ 5,13 <sup>abc</sup>	2,90 $\pm$ 1,37 <sup>ab</sup>
25/6/48	77,53 $\pm$ 5,15 <sup>cd</sup>	74,60 $\pm$ 6,47 <sup>bc</sup>	20,17 $\pm$ 6,42 <sup>cd</sup>
25/6/72	77,26 $\pm$ 4,59 <sup>bcd</sup>	72,81 $\pm$ 5,15 <sup>abc</sup>	51,61 $\pm$ 16,49 <sup>fg</sup>
25/12/24	75,33 $\pm$ 5,09 <sup>abcd</sup>	71,71 $\pm$ 6,21 <sup>abc</sup>	3,39 $\pm$ 1,39 <sup>a</sup>
25/12/48	76,72 $\pm$ 3,60 <sup>abcd</sup>	72,38 $\pm$ 4,03 <sup>abc</sup>	32,43 $\pm$ 7,45 <sup>def</sup>
25/12/72	75,67 $\pm$ 4,04 <sup>abcd</sup>	71,49 $\pm$ 5,87 <sup>abc</sup>	51,96 $\pm$ 11,62 <sup>fg</sup>
35/3/24	73,90 $\pm$ 4,15 <sup>abc</sup>	67,09 $\pm$ 3,84 <sup>a</sup>	3,36 $\pm$ 1,70 <sup>ab</sup>
35/3/48	72,87 $\pm$ 3,92 <sup>abc</sup>	66,67 $\pm$ 3,56 <sup>a</sup>	61,80 $\pm$ 6,03 <sup>g</sup>
35/3/72	75,11 $\pm$ 3,09 <sup>abcd</sup>	68,49 $\pm$ 4,55 <sup>ab</sup>	25,97 $\pm$ 3,36 <sup>cde</sup>
35/6/24	72,31 $\pm$ 4,47 <sup>a</sup>	68,00 $\pm$ 4,42 <sup>a</sup>	20,32 $\pm$ 6,57 <sup>cd</sup>
35/6/48	74,21 $\pm$ 3,75 <sup>abc</sup>	66,67 $\pm$ 4,75 <sup>a</sup>	48,51 $\pm$ 13,06 <sup>fg</sup>
35/6/72	74,13 $\pm$ 3,33 <sup>abc</sup>	67,35 $\pm$ 3,72 <sup>a</sup>	51,89 $\pm$ 5,09 <sup>fg</sup>
35/12/24	72,30 $\pm$ 3,90 <sup>ab</sup>	67,92 $\pm$ 4,11 <sup>a</sup>	32,08 $\pm$ 1,72 <sup>def</sup>
35/12/48	73,43 $\pm$ 3,57 <sup>abc</sup>	66,79 $\pm$ 3,68 <sup>a</sup>	43,54 $\pm$ 6,53 <sup>efg</sup>
35/12/72	73,88 $\pm$ 3,13 <sup>abc</sup>	67,05 $\pm$ 3,65 <sup>a</sup>	59,23 $\pm$ 9,74 <sup>g</sup>

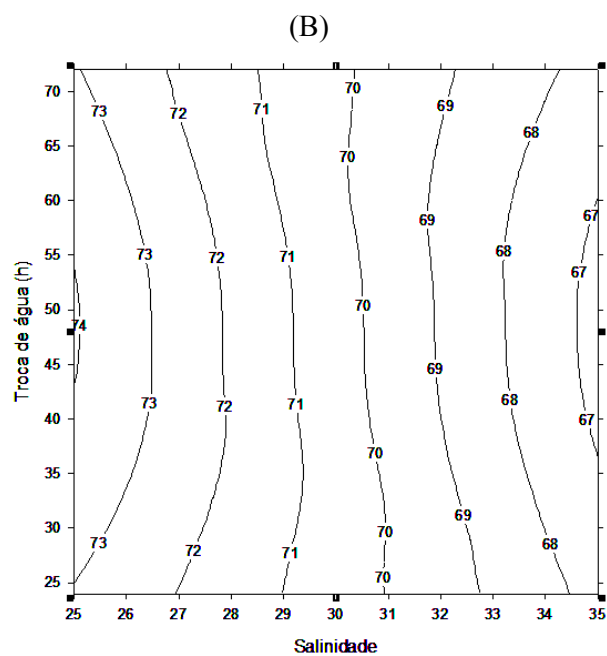
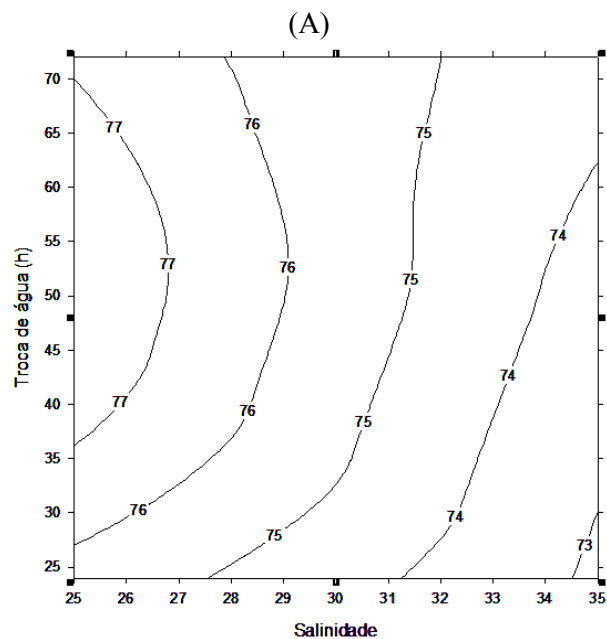
Letras indicam a ordem de significância (SNK; P<0,05)

Todos os fatores com exceção da interação salinidade x densidade (P = 0,1942) e densidade x tempo de troca de água (P = 0,0656), apresentaram efeito significativo sobre a sobrevivência (P<0,05).

Dentre as variáveis testadas, salinidade e tempo de troca de água apresentaram efeito significativo no comprimento das larvas, porém somente a salinidade teve efeito na altura (P<0,05). Os efeitos da salinidade e troca de água sobre o crescimento (comprimento e altura) e sobrevivência larval são mostrados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

1 Através da análise de regressão múltipla entre o crescimento e o efeito da salinidade e  
 2 troca de água foram observados que  $r^2=0,7667$  (comprimento) e  $r^2=0,8904$  (altura)  
 3 determinaram uma correspondência significativa para ambos os dados. Em relação a  
 4 sobrevivência, também foi verificada correspondência significativa com o efeito da salinidade  
 5 e troca de água ( $r^2=0,6624$ ).

6



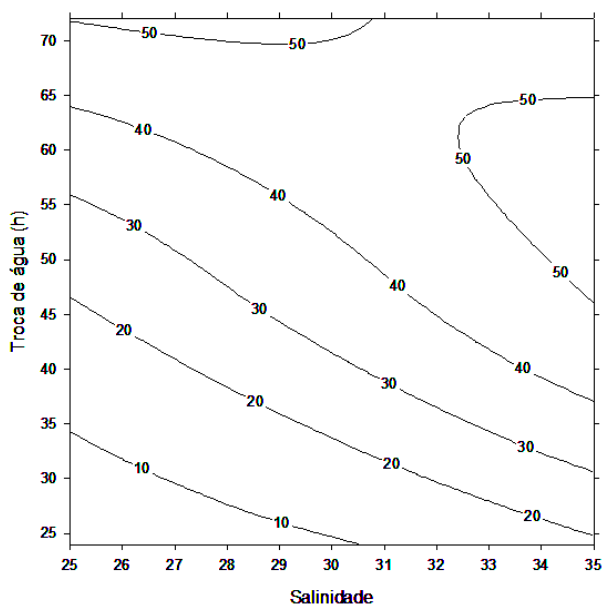
10 Figura 1: Superfície de resposta do comprimento (A) e altura (B) ( $\mu\text{m}$ ) das larvas de *C. rhizophorae* ao 6º dia,  
 11 cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h).

12

1 Através da análise da Figura 1 pode-se observar que o maior comprimento (superior  
2 ou igual a  $77\mu\text{m}$ ) foi alcançado em salinidades inferiores a 27 e trocas de água entre 36 e 70h.  
3 A maior altura (igual ou superior a  $74\mu\text{m}$ ) foi verificada em salinidades iguais ou inferiores a  
4 25 e trocas de água entre 44 e 54h. Com o aumento da salinidade acima de 34,5 foram  
5 verificados os menores valores de comprimento ( $73\mu\text{m}$ ) e altura ( $67\mu\text{m}$ ).

6 A sobrevivência apresentou duas áreas de superfície de resposta igual ou superior a  
7 50%, a primeira delimitada pelas salinidades de 25 a 31 com trocas de água acima de 70h e a  
8 segunda com salinidades superiores a 32,5 e trocas de água entre 46 e 65h. Com trocas de  
9 água inferiores a 35h a sobrevivência apresentou seu valor mais baixo (10%).

10 As densidades de estocagem testadas não apresentaram diferença significativa  
11 ( $P>0,05$ ) para o crescimento, porém para a sobrevivência, as densidades de 6 e 12 larvas. $\text{mL}^{-1}$   
12 foram estatisticamente superiores a densidade de 3 larvas. $\text{mL}^{-1}$ .



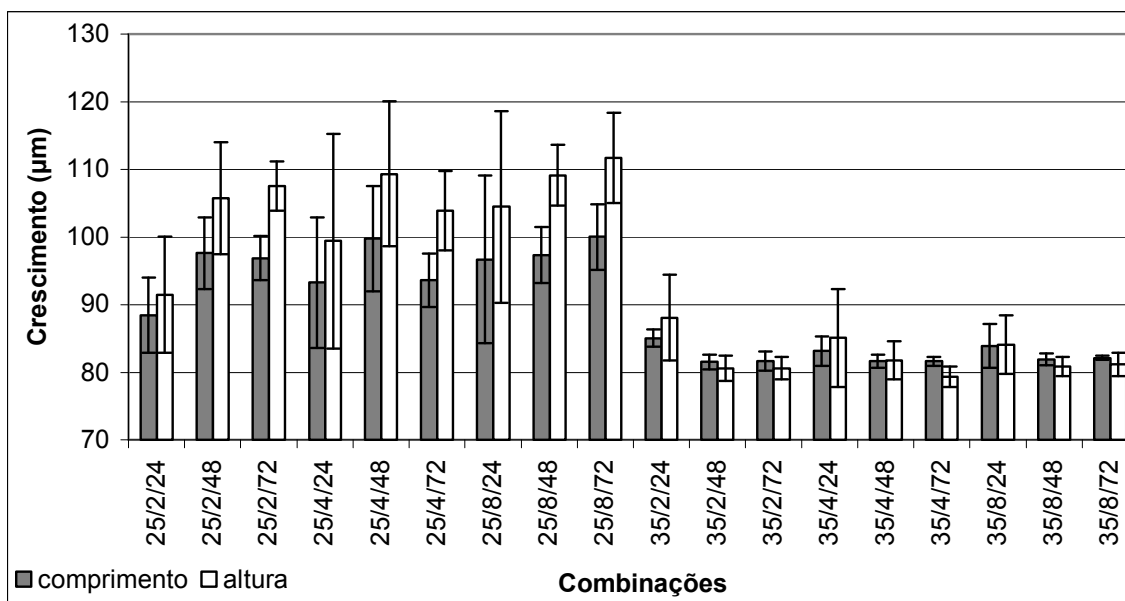
13  
14 Figura 2: Superfície de resposta da sobrevivência (%) das larvas de *C. rhizophorae* ao 6º dia, cultivadas sob  
15 diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h).

### 17 3.2. Experimento 2

18 As larvas de *C. rhizophorae* foram cultivadas entre o 7 e o 14º dia em duas salinidades  
19 (25 e 35), sendo o tamanho inicial das larvas para iniciar o experimento 2, estatisticamente  
20 diferente e igual a  $82,44 \pm 4,67$  e  $82,13 \pm 6,77 \mu\text{m}$  e  $78,89 \pm 3,31$  e  $74,91 \pm 4,49 \mu\text{m}$ ,  
21 comprimento e altura respectivamente.

22 Comparando-se isoladamente os valores finais, no 14º dia de cultivo, de comprimento  
23 e altura nas salinidades de 25 e 35, se pôde constatar que as variáveis testadas (densidade e

1 troca de água) não influenciaram os resultados ( $P>0,05$ ). Porém em relação à sobrevivência,  
 2 tanto as variáveis testadas como a interação delas (densidade x troca de água), apresentaram  
 3 influência nos resultados ( $P<0,05$ ). Os tamanhos finais das larvas são apresentados na Figura  
 4 3.



5  
 6 Figura 3: Crescimento médio em comprimento e altura ( $\mu\text{m}$ ) e respectivo desvio padrão das larvas de *C.*  
 7 *rhizophorae*, obtido no 14º dia de cultivo nas combinações testadas de salinidade (25 e 35), densidade (3, 6 e 12  
 8 larvas.mL<sup>-1</sup>) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h). Tamanho médio inicial das larvas de 25 de  $82,44 \pm 4,67$  e  
 9  $82,13 \pm 6,77 \mu\text{m}$  e 35 de  $78,89 \pm 3,31$  e  $74,91 \pm 4,49 \mu\text{m}$ , comprimento e altura, respectivamente.

10  
 11 Os valores médios dos percentuais de crescimento (PC) do comprimento e altura e  
 12 sobrevivência das larvas no 14º dia, cultivadas em duas salinidades, três densidades de  
 13 estocagem e três tempos de troca de águas diferentes, são mostrados na Tabela 2.

14  
 15  
 16  
 17  
 18  
 19  
 20  
 21  
 22  
 23  
 24  
 25  
 26

1 Tabela 2: Valores médios e respectivos desvios padrões dos percentuais de crescimento (PC) do comprimento e  
 2 altura e da sobrevivência das larvas de *C. rhizophorae* obtidos no 14º dia de cultivo nas combinações testadas de  
 3 salinidade (25 e 35), densidade (2, 4 e 8 larvas.mL<sup>-1</sup>) e tempo de troca de água (24, 48 e 72h), classificados  
 4 segundo o teste SNK.

<b>Combinações (salinidade/ larvas.mL<sup>-1</sup>/h)</b>	<b>PC Comprimento (%) ± desvio padrão (n=90)</b>	<b>PC Altura (%) ± desvio padrão (n=90)</b>	<b>Sobrevivência (%) ± desvio padrão</b>
25/2/24	7,28 ± 6,71 <sup>ab</sup>	11,36 ± 10,42 <sup>abc</sup>	11 ± 0,50 <sup>gh</sup>
25/2/48	18,40 ± 6,44 <sup>ab</sup>	28,70 ± 10,08 <sup>abcd</sup>	15,13 ± 3,21 <sup>h</sup>
25/2/72	17,52 ± 3,92 <sup>ab</sup>	30,86 ± 4,44 <sup>bcd</sup>	6,57 ± 0,26 <sup>cdefg</sup>
25/4/24	13,12 ± 11,71 <sup>ab</sup>	21,02 ± 19,31 <sup>abcd</sup>	4,20 ± 2,17 <sup>abcde</sup>
25/4/48	21,02 ± 9,43 <sup>b</sup>	33,08 ± 13,03 <sup>cd</sup>	13,83 ± 2,96 <sup>h</sup>
25/4/72	13,56 ± 4,82 <sup>ab</sup>	26,45 ± 7,16 <sup>abcd</sup>	5,61 ± 0,11 <sup>bcdef</sup>
25/8/24	17,29 ± 15,06 <sup>ab</sup>	27,20 ± 17,24 <sup>abcd</sup>	3,13 ± 1,32 <sup>abc</sup>
25/8/48	18,05 ± 4,98 <sup>ab</sup>	32,88 ± 5,49 <sup>bcd</sup>	14,86 ± 4,35 <sup>h</sup>
25/8/72	21,34 ± 5,87 <sup>b</sup>	36,00 ± 8,08 <sup>d</sup>	8,56 ± 2,35 <sup>fg</sup>
35/2/24	7,79 ± 1,65 <sup>ab</sup>	17,59 ± 8,47 <sup>abcd</sup>	5,73 ± 0,23 <sup>bcdef</sup>
35/2/48	3,33 ± 1,38 <sup>a</sup>	7,58 ± 2,48 <sup>abc</sup>	7,03 ± 1,40 <sup>defg</sup>
35/2/72	3,45 ± 1,82 <sup>a</sup>	7,60 ± 2,19 <sup>ab</sup>	5,81 ± 0,26 <sup>bcdef</sup>
35/4/24	5,35 ± 2,81 <sup>ab</sup>	13,59 ± 9,69 <sup>abcd</sup>	2,75 ± 0,92 <sup>ab</sup>
35/4/48	3,47 ± 1,26 <sup>a</sup>	9,16 ± 3,73 <sup>abc</sup>	6,72 ± 1,03 <sup>cdefg</sup>
35/4/72	3,46 ± 0,82 <sup>a</sup>	5,94 ± 2,02 <sup>a</sup>	5,84 ± 1,03 <sup>bcdef</sup>
35/8/24	5,42 ± 4,11 <sup>ab</sup>	10,84 ± 5,76 <sup>abcd</sup>	3,9 ± 1,54 <sup>abcd</sup>
35/8/48	3,84 ± 1,12 <sup>a</sup>	7,89 ± 1,92 <sup>ab</sup>	8,21 ± 0,96 <sup>efg</sup>
35/8/72	4,08 ± 0,39 <sup>a</sup>	8,36 ± 2,34 <sup>abc</sup>	2,33 ± 1,11 <sup>a</sup>

5 Letras indicam a ordem de significância (SNK; P<0,05)

6

7 Os percentuais de crescimento do comprimento e da altura foram influenciados  
 8 estatisticamente (P<0,05) pela salinidade e pela interação salinidade x troca de água (Figura  
 9 4). A sobrevivência foi influenciada por todos os fatores e suas interações, com exceção da  
 10 interação salinidade x densidade (P>0,05). A Figura 5 apresenta a sobrevivência em função  
 11 das interações de salinidade x troca de água e densidade de estocagem x troca de água.

12 Através da análise de regressão múltipla entre os percentuais de crescimento e o efeito  
 13 da salinidade e troca de água foram observados que  $r^2=0,7915$  (PC do comprimento) e  
 14  $r^2=0,7244$  (PC da altura), determinando uma correspondência significativa para ambos os  
 15 dados. Em relação à sobrevivência não foi verificada correspondência com o efeito da  
 16 salinidade e troca de água ( $r^2=0,2493$ ).

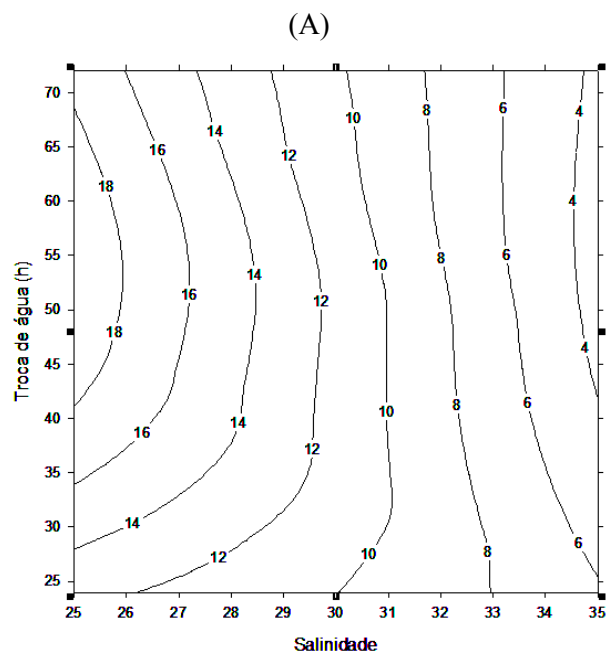
17

18

19

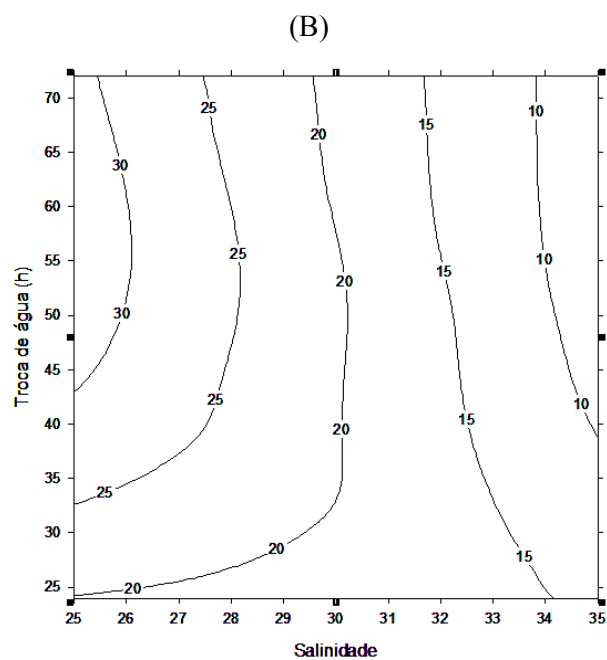
20

1



2

3



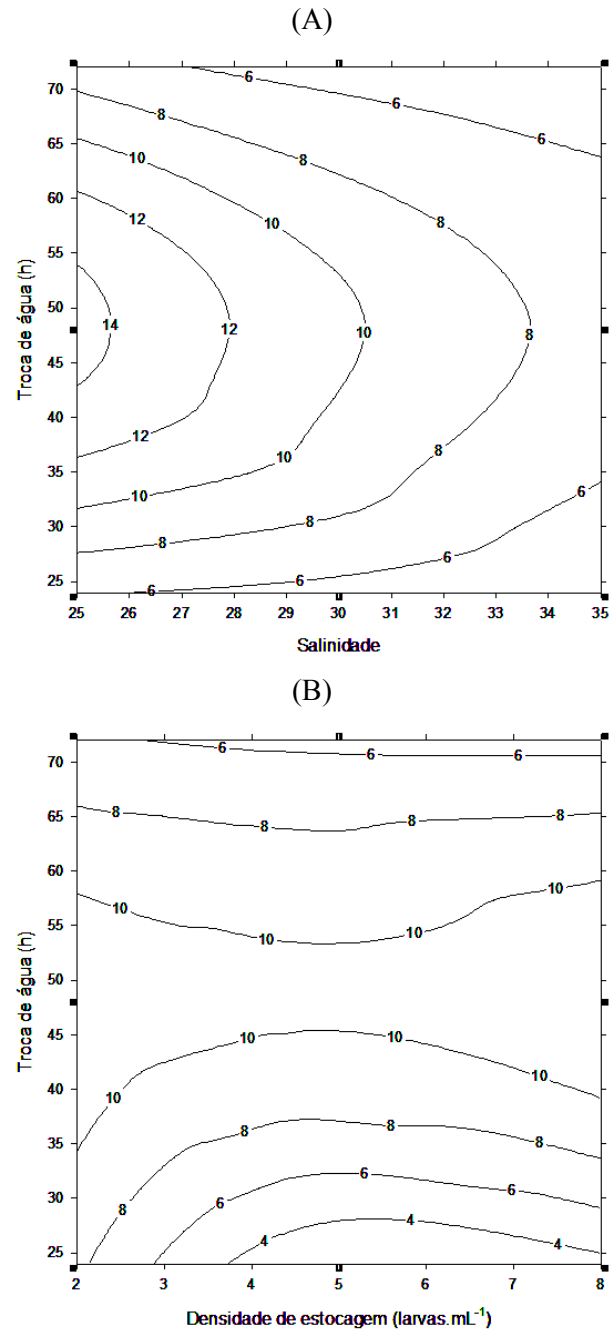
4

5 Figura 4: Superfície de resposta dos percentuais de crescimento (%) do comprimento (A) e altura (B) das larvas  
6 de *C. rhizophorae* ao 14º dia, cultivadas sob diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24,  
7 48 e 72h).

8

9 O maior PC do comprimento (igual ou superior a 18%) foi observado em salinidades  
10 inferiores a 26 e trocas de água entre 42 e 68h e o maior PC da altura (superior ou igual a  
11 30%) foi verificado em salinidades inferiores a 26 e trocas de água acima de 43h. As  
12 densidades de estocagem foram estatisticamente iguais ( $P > 0,05$ ). Os menores percentuais de  
13 crescimento, tanto para comprimento como altura, foram verificados em salinidades  $\geq$  a 34.

1 A sobrevivência obteve seu maior valor (superior ou igual a 14%) em salinidades  
 2 inferiores a 26 e trocas de água entre 44 e 54h e em qualquer uma das densidades testadas (2,  
 3 4 e 8 larvas.mL<sup>-1</sup>).



8 Figura 5: Superfície de resposta da sobrevivência (%) das larvas de *C. rhizophorae* ao 14º dia, cultivadas sob  
 9 diferentes combinações de salinidade (25 e 35) e troca de água (24, 48 e 72h) (A) e densidade de estocagem (2, 4  
 10 e 8 larvas.mL<sup>-1</sup>) e troca de água (24, 48 e 72h) (B).

11  
 12



#### 1 4. Discussão

2 No presente estudo, a embriogênese de *C. rhizophorae* sob temperatura de 25°C e  
3 salinidade de 30 esteve de acordo com Dos Santos e Nascimento (1985), que verificaram para  
4 a mesma espécie, que a maior formação de larvas-D, 24h após a fertilização, ocorreu nas  
5 temperaturas de 20 e 25°C e entre as salinidades de 25 e 37. Tan e Wong (1996) observaram  
6 para *C. belcheri*, uma ostra tropical da Malásia, salinidades ótimas de 24 a 30 para o seu  
7 desenvolvimento embrionário e concluíram que as ostras tropicais em geral necessitam de  
8 maiores salinidades para o desenvolvimento de ovos a larvas-D. Sudrajat (1990), testando o  
9 efeito da salinidade no desenvolvimento embrionário de *C. iredalei* e *Saccostrea cucullata*,  
10 encontrou a salinidade ótima de 25. O comprimento inicial das larvas de *C. rhizophorae*  
11 observado neste trabalho ( $64,42 \pm 2,78$ ) foi maior que comprimento de 57,6 µm encontrado  
12 por Miranda e Guzenski (1999), utilizando salinidade de 30 e temperatura de 25°C na  
13 incubação dos ovos a larva-D.

14 No primeiro experimento, a maior sobrevivência ( $\geq 50\%$ ) foi verificada em  
15 salinidades superiores a 32,5, porém esta foi similar a salinidade entre 25 e 31 com trocas de  
16 água acima de 70h. Lemos et al. (1994) corroboram os resultados encontrados no presente  
17 trabalho verificando que até o sétimo dia de cultivo salinidades superiores a 30 resultavam em  
18 melhores sobrevivências.

19 No segundo experimento as salinidades  $\leq 26$  determinaram a maior sobrevivência  
20 larval ( $\geq 14\%$ ). Este resultado é apoiado por diversos autores que reportam que a salinidade  
21 abaixo da oceânica tem sido observada como sendo a mais ideal para o desenvolvimento  
22 larval e sobrevivência de ostras como *O. edulis* (22,5 a 27) (Davis & Ansell, 1962), *C.*  
23 *virginica* (17,5 a 27) (Davis & Calabrese, 1964), *C. rivularis* (20) (Breese & Malouf, 1977),  
24 *C. gigas* (25) (Helm & Milican, 1977), *S. echinata* (20 a 30) (Coeroli et al., 1984), *C. iredalei*  
25 (20 a 30) e *S. cucullata* (25 a 30) (Sudrajat, 1990) e *C. belcheri* (12 a 24) (Tan & Wong,  
26 1996).

27 O crescimento das larvas foi influenciado somente pela salinidade e pela troca de água  
28 nos dois experimentos. Os melhores resultados de crescimento (experimento 1) e percentual  
29 de crescimento (experimento 2), em comprimento e altura, foram observados em salinidades  
30 inferiores a 27. Estas salinidades ( $\leq 27$ ) situam-se entre a faixa de 25 e 30 descrita como sendo  
31 a que promove o melhor crescimento em *C. rhizophorae* (Lemos et al., 1994).

32 Helm e Millican (1977) observaram que trocas de água mais freqüentes que 48h  
33 afetavam negativamente o crescimento larval de *C. gigas*. Yan et al. (2006) verificaram que  
34 trocas de água de 50% a cada 72h, determinavam o melhor crescimento larval em *Ruditapes*

1 *philippinarum*. Lemos et al. (1994) e Miranda e Guzenski (1999) utilizaram a troca de água a  
2 cada 48h em larviculturas de *C. rhizophorae*.

3 No presente trabalho, o melhor crescimento larval e sobrevivência em ambos os  
4 experimentos, foram verificados em trocas de água acima de 36h. Estes resultados concordam  
5 com os obtidos por Oliveira (1998) que testou o efeito de três tempos de troca de água (24, 48  
6 e 72h) obtendo a melhor sobrevivência larval de *C. gigas*, durante a primeira semana, com  
7 trocas de água a acima de 24h. A troca de água a cada 48h (Ibarra et al, 1997; Ponis et al.,  
8 2003a,b; Labarta et al., 1999; Doroudi & Southgate, 2000) vem sendo a mais utilizada nas  
9 larviculturas de moluscos bivalves. A utilização de trocas de água superiores a 36h, apresenta  
10 uma redução nos custos de produção, no manejo e no estresse gerado nas larvas. A troca de  
11 água diária afetou negativamente todos os resultados, possivelmente devido ao estresse  
12 gerado nas peneiragens e lavagens das larvas.

13 O efeito da densidade de estocagem no crescimento larval de moluscos bivalves  
14 normalmente é reportado como tendo uma relação inversa, ou seja, o melhor crescimento é  
15 alcançado nas menores densidades (Davis, 1953; Gruffydd & Beaumont, 1972; Rojas et al.,  
16 1988; Ibarra et al., 1997; Miranda & Guzenski, 1999). O presente estudo não verificou esta  
17 tendência, uma vez que as três densidades de estocagem utilizadas foram estatisticamente  
18 semelhantes nos dois experimentos. Possivelmente este fato ocorreu devido as densidades  
19 utilizadas se encontrarem dentro de um intervalo pequeno, as quais são comumente utilizadas  
20 em laboratórios de produção. Entretanto, a sobrevivência foi afetada pela densidade de  
21 estocagem nos dois experimentos, sendo ao final da primeira semana (experimento 1) o  
22 melhor resultado observado nas densidades de 6 (32,56%) e 12 larvas.mL<sup>-1</sup> (37,10%). Na  
23 segunda semana, a sobrevivência nas densidades testadas foram estatisticamente similares.  
24 Dessa forma, se torna mais viável economicamente para uma hatchery o uso das densidades  
25 de 12 e 8 larvas.mL<sup>-1</sup>, primeira e segunda semana respectivamente.

26 A baixa sobrevivência obtida no experimento 2 pode estar relacionada com a não  
27 utilização de antibióticos e/ou com a dieta utilizada. Estudos realizados com o cultivo larval  
28 de *C. rhizophorae* sem o uso de antibiótico somente conseguiram chegar ao 7º dia (Miranda e  
29 Guzenski, 1999) e 9º dia (Lemos et al., 1994). O uso de antibióticos como cloranfenicol  
30 (Ponis et al., 2003b), estreptomicina e penicilina (Thompson, 1996), entre outros ainda é  
31 comum em hatcheries.

32 Durante o experimento 1, a dieta monoalgal baseada na utilização de *T. pseudonana* e  
33 durante o experimento 2 com o acréscimo da diatomácea *C. muelleri*, podem não ter suprido  
34 as necessidades nutricionais das larvas de *C. rhizophorae*. Porém, a microalga *T. pseudonana*

1 foi utilizada como único alimento durante larvicultura de *C. gigas*, obtendo melhores  
2 resultados em relação à sobrevivência e crescimento larval quando comparada com a espécie  
3 *Pavlova lutheri*, comumente utilizada em laboratórios de produção de sementes de moluscos  
4 bivalves (Thompson et al., 1996). Também é conhecido que espécies do gênero *Chaetoceros*  
5 em geral são consideradas como alimentos com bom valor nutricional para bivalves e *C.*  
6 *muelleri* (=gracilis), em particular, tem se apresentado como uma das espécies de maior valor  
7 nutricional para ostras (Enright et al., 1986a,b).

8 Baseado nos resultados deste estudo é recomendado que as larvas de *C. rhizophorae*  
9 sejam cultivadas em salinidades inferiores a 27 e trocas de água acima de 36h com densidades  
10 de 12 larvas mL<sup>-1</sup> e 8 larvas mL<sup>-1</sup>, primeira e segunda semana respectivamente.

11 Torna-se necessário a realização de futuros estudos que testem uma maior faixa de  
12 salinidade e densidades mais elevadas, além de realizar essas comparações durante todo o  
13 desenvolvimento larval até o assentamento.

14 Outro fator que deve ser levado em consideração é a temperatura utilizada, a qual não  
15 foi manipulada durante o experimento, porém esta variável deve ser avaliada ao longo do ano,  
16 para verificar se em épocas mais quentes, os resultados seriam similares aos observados neste  
17 trabalho.

## 19 Referências

- 20 BREESE, W. P.; MALOUF, R. E. 1975. Hatchery manual for the Pacific oyster. Oregon state  
21 University Sea grant College Program. Publication ORESU-H-75-002, 22p.
- 22 BREESE, W. P.; MALOUF, R. E. 1977. Hatchery rearing techniques for the oyster  
23 *Crassostrea rivularis* Gould. Aquaculture, 12: 123-126.
- 24 COEROLI, M.; DE GAILLANDE, D.; LANDRET, J. P. ; COATANEA, D. 1984. Recent  
25 innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. Aquaculture, 39: 45-67.
- 26 DAVIS, H. C. 1953. On food and feeding of larvae of the American oyster, *C. virginica*. Bio.  
27 Bull., 104: 334-350.
- 28 DAVIS, H. C.; ANSELL, A. D. 1962. Survival and growth of larvae of the European oyster  
29 *Ostrea edulis* at lowered salinities. Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole, 122: 133-139.
- 30 DAVIS, H. C.; CALABRESE, A. 1964. Combined effects of temperature and salinity on  
31 development of eggs and growth of larval of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea*  
32 *virginica*. Fisheries Bulletin U. S. Fish and Wildlife Service, 63: 643-655.

- 1 DEVAKIE, M. N.; ALI, A. B. 2000. Salinity-temperature and nutritional effects on the setting  
2 rate of larvae of the tropical oyster *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture*, 184:105-  
3 114.
- 4 DOROUDI, M. S., SOUTHGATE, P. S., MAYER, R. J. 1999. The combined effects of  
5 temperature and salinity on embryos and larvae of black-lip pearl oyster, *Pinctada*  
6 *margaritifera* (Linnaeus). *Aquaculture Research*, 30:271-277.
- 7 DOROUDI, M. S., SOUTHGATE, P. S. 2000. The influence of algal ration and larval density  
8 on growth and survival of the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.) larvae.  
9 *Aquaculture Research*, 31: 621-626.
- 10 DOROUDI, M. S.; SOUTHGATE, P. C.; MAYER, R. J. 2002. Evaluation of partial  
11 substitution of live algae with dried *Tetraselmis* for larval rearing of black-lip pearl oyster,  
12 *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture International*, 10: 265-277.
- 13 DOS SANTOS, A. E.; NASCIMENTO, I. A. 1985. Influence of gamete density, salinity and  
14 temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea*  
15 *rhizophorae* (Guilding, 1828). *Aquaculture*, 47: 335-352.
- 16 ENRIGHT, C. T., NEWKIRK, G. F., CRAIGIE, J. S., CASTELL, J. D. 1986a. Evaluation of  
17 phytoplankton as diets for juvenile *Ostrea edulis* L. *Journal of Experimental Marine Biology*  
18 *and Ecology*, 96: 1– 13.
- 19 ENRIGHT, C. T., NEWKIRK, G. F., CRAIGIE, J. S., CASTELL, J. D., 1986b. Growth of  
20 juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros calcitrans* Schütt of varied chemical composition.  
21 *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 96: 15-26.
- 22 GRUFFYDD, LI. D.; BEAUMONT, A. R. 1972. A method for rearing *Pecten maximus* in the  
23 laboratory. *Marine Biology*, 15: 350-355.
- 24 HELM, M. M.; MILLICAN, P. F. 1977. Experiments in the hatchery rearing of the Pacific  
25 oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 11: 1-12.
- 26 IBARRA, A. M.; RAMIREZ, J. L.; GARCIA, G. A. 1997. Stocking density effects on larval  
27 growth and survival of two catarina scallops, *Argopecten ventricosus* (=circularis)  
28 (SOWERBY II, 1842), populations. *Aquaculture Research*, 28: 443-451.
- 29 KINNE, O., 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water  
30 animals: II. Salinity and temperature salinity combinations. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*,  
31 2: 281– 339.
- 32 LABARTA, U.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; PÉREZ-CAMACHO, A. 1999. Larvae of  
33 *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates.  
34 *Hydrobiologia*, 405: 125-131.

- 1 LEMOS, M. B. N.; NASCIMENTO, I. A.; DE ARAUJO, M. M. S.; PEREIRA, S. A.;  
2 BAHIA, I.; SMITH, D. 1994. The combined effects of salinity, temperature, antibiotic and  
3 aeration on larval growth and survival of the mangrove oyster, *Crassostrea rhizophorae*.  
4 Journal of Shellfish Research, vol. 13-1: 187-192.
- 5 LOOSANOFF, V. L.; DAVIS, H. C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. In: Advances in  
6 Marine Biology, vol. 1. Academic Press, London, pp. 1-136.
- 7 MIRANDA, M. B. B.; GUZENSKI, J. 1999. Cultivo larval da ostra de mangue, *Crassostrea*  
8 *rhizophorae* (Guilding, 1828), em diferentes condições de temperatura, salinidade e  
9 densidade. Arquivos de Ciências do Mar, 32: 73-84.
- 10 NOMURA, H. 1960. Considerações sobre amostragem de peixes marinhos. Boletim do  
11 Instituto Oceanográfico. São Paulo, n. 11, v. 1, p. 99-110.
- 12 OLIVEIRA, J. M. 1998. Efeitos da densidade populacional e renovação da água no  
13 crescimento e sobrevivência larval da ostra *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793).  
14 Dissertação apresentada ao Mestrado em Aquicultura - Programa de Pós-Graduação em  
15 Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a  
16 obtenção do título de Mestre. 122p.
- 17 PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G. 2003a. Nutritional value of fresh and concentrated  
18 algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). Aquaculture, 221: 491-  
19 505.
- 20 PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G.; TREDICI, M. 2003b. Assessment of the performance  
21 of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri*  
22 concentrates. Aquaculture International, 11: 69-79.
- 23 ROJAS, L. M.; VELEZ, A.; AZUAJE, O. 1988. Efecto individual y combinado de la  
24 densidad larval y la ración de alimento sobre la supervivencia y crecimiento de la vieira,  
25 *Pecten ziczac*. Boletín del Instituto de Oceanografía. Venezuela, Universidad de Oriente, 27  
26 (1-2): 57-62.
- 27 SOUTHGATE, P. C., ITO, M. 1998. Evaluation of a partial flow-through culture technique  
28 for pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) larvae. Aquacultural Engineering 18 : 1-7.
- 29 SUDRAJAT, A. 1990. Studies on the reproductive biology and culture of the rock oyster,  
30 *Saccostrea cucullata* (Born) and slipper oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). Ph.D. Thesis,  
31 University College of Swansea.
- 32 TAN, S. H; WONG, T. M. 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and  
33 settling in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). Aquaculture, 145:129-139.

- 1 THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P. J. 1996. Nutritional value of diets that vary in
- 2 fatty acid composition for larval Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 143: 379-
- 3 391.
- 4 WALNE, P. R. 1964. The culture of marine bivalve larvae. In: *Physiology of Mollusca*. New
- 5 York: Academic Press, Cap. 6, v. 1, p. 197-210.
- 6 YAN, X.; ZHANG, G.; YANG, F. 2006. Effects of diet, stocking density, and environmental
- 7 factors on growth, survival, and metamorphosis of Manila clam *Ruditapes philippinarum*
- 8 larvae. *Aquaculture*, 253: 350-358.
- 9 ZAR, J. H. 1984. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, London, 718 pp.

## 5. COMENTÁRIOS FINAIS

Baseado nos resultados deste estudo é recomendado que as larvas de *C. rhizophorae* sejam cultivadas em salinidades inferiores a 27 e trocas de água a cada 48h com densidades de 12 larvas mL<sup>-1</sup> e 8 larvas mL<sup>-1</sup>, primeira e segunda semana respectivamente.

Torna-se necessário a realização de futuros estudos que testem uma maior faixa de salinidade e densidades mais elevadas, além de realizar essas comparações durante todo o desenvolvimento larval até o assentamento.

A alimentação das larvas de *C. rhizophorae*, deve ser mais bem estudada, principalmente referente a determinação da melhor dieta algal, quantidade de alimento e frequência alimentar.

O sistema de troca de água (estático), utilizado no presente trabalho deve ser comparado com sistemas contínuos ou parcialmente contínuos com reutilização da água, os quais podem ser viáveis para a produção de sementes de *C. rhizophorae* no LAMARSU, por desprover de água em abundância, além de poder aumentar a produção em pequenas unidades de cultivo.

Outro fator que deve ser levado em consideração é a temperatura utilizada, a qual não foi manipulada durante o experimento, porém esta variável deve ser avaliada ao longo do ano, para verificar se em épocas mais quentes, os resultados seriam similares aos observados neste trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKABOSHI, S.; PEREIRA, O.M.; JACOBSEN, O.; YAMANAKA, N. 1979. Fecundação e crescimento larval de ostra *Crassostrea gigas* em laboratório, Cananéia – SP. Boletim do Instituto de Pesca, vol. 9, p. 45 – 50.

AKABOSHI, S.; PEREIRA, O.M.; SINQUE, C. 1983. Cultivo experimental da *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) na região estuarina lagunar de Cananéia (25° 05'S; 48° 01'W) São Paulo, Brasil. Boletim do Instituto de Pesca. 10 (único), p. 1-8.

ANDERSON, R. D.; ANDERSON, J. W. 1975. Effects of salinity and selected petroleum hydrocarbons on the osmotic and chloride regulation of the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Physiol. Zoology*, 43: 420-430.

ANTONIO, Í. G. 2004. Dimensionamento de um laboratório para a produção de sementes de moluscos bivalves, com ênfase à ostra nativa *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828) na Universidade Federal Rural de Pernambuco. Monografia apresentada ao curso de Engenharia de Pesca, como parte dos requisitos para obtenção do título de Engenheiro de Pesca. Recife. UFRPE. 50 p.

BERNARD, F. R. 1983. Physiology and the mariculture of some northeastern Pacific bivalve molluscs. *Canadian Spec. Publ. Fish. Aquat. Sci.* 28p.

BROWN, M.; ROBERT, R. 2002. Preparation and assessment of microalgal concentrates as feeds for larval and juvenile Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 207: 289– 309.

CASTAGNA, M.; CHANLEY, P. 1973. Salinity tolerances of some marine bivalves from inshore and estuarine environments in Virginia waters on the western mid-Atlantic coast. *Malacologia*, 12: 47-96.

COEROLI, M.; DE GAILLANDE, D.; LANDRET, J. P. ; COATANEA, D. 1984. Recent innovations in cultivation of molluscs in French Polynesia. *Aquaculture*, 39: 45-67.



DEVAKIE, M. N.; ALI, A. B. 2000. Salinity-temperature and nutritional effects on the setting rate of larvae of the tropical oyster *Crassostrea iredalei* (Faustino). *Aquaculture*, 184: 105-114

DONALDSON, J. 1991. Comercial production of microalgae at COSAT Oyster Company. P.229-236. In *Rotifer and Microalgae Culture Systems*. Proceedings of a U.S. Asia Workshop. Honolulu.

DOROUDI, M. S., SOUTHGATE, P. S. 2000. The influence of algal ration and larval density on growth and survival of the blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.) larvae. *Aquaculture Research*, 31: 621-626.

DOROUDI, M. S.; SOUTHGATE, P. C.; MAYER, R. J. 2002. Evaluation of partial substitution of live algae with dried *Tetraselmis* for larval rearing of black-lip pearl oyster, *Pinctada margaritifera* (L.). *Aquaculture International*, 10: 265-277.

DOS SANTOS, A. E.; NASCIMENTO, I. A. 1985. Influence of gamete density, salinity and temperature on the normal embryonic development of the mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828). *Aquaculture* 47: 335-352.

FAO. 2004. *The state of World Fisheries and Aquaculture*. Rome, Italy. 153 p.

FAOa. 2006. Fisheries Department, Fishery Information, Data and Statistics Unit. *FISHSTAT Plus: Universal Software For Fishery Statistical Time Series*. Version 2.3.

FAOb. 2006. *State of World Aqualculture: 2006*. Rome, Italy. 145 p.

GRUFFYDD, LI. D.; BEAUMONT, A. R. 1972. A method for rearing *Pecten maximus* in the laboratory. *Marine Biology*, 15: 350-355.

HADLEY, N. H.; DILLON, R. T. Jr; MANZI, J. J. 1991. Realized heritability of growth rate in the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Aquaculture*, 93: 109-119.

HELM, M. M.; BOURNE, N. ; LOVATELLI, A. 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. FAO Fisheries Technical Paper. N° 471. Rome, FAO. 177 p.

HELM, M. M.; MILLICAN, P. F. 1977. Experiments in the hatchery rearing of the Pacific oyster larvae *Crassostrea gigas* (Thunberg). *Aquaculture*, 11: 1-12.

HILBISH, T. J., WINN, E. P.; RAWSON, P. D. 1993. Genetic variation and covariation during larval and juvenile growth in *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, 115: 97-104.

IBARRA, A. M.; RAMIREZ, J. L.; GARCIA, G. A. 1997. Stocking density effects on larval growth and survival of two catarina scallops, *Argopecten ventricosus* (=circularis) (SOWERBY II, 1842), populations. *Aquaculture Research*, 28: 443-451.

KALYANASUNDARAM, M., RAMAMOORTHY, K., 1986. Temperature and salinity requirements for embryonic development of *Saccostrea cucullata* (Born). *Bull. Natl. Inst. Ocean.* 19: 53–55.

KINNE, O., 1964. The effects of temperature and salinity on marine and brackish water animals: II. Salinity and temperature salinity combinations. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.*, 2: 281– 339.

LABARTA, U.; FERNÁNDEZ-REIRIZ, M. J.; PÉREZ-CAMACHO, A. 1999. Larvae of *Ostrea edulis* (L.) during starvation: growth, energy and biochemical substrates. *Hydrobiologia*, 405: 125-131.

LOOSANOFF, V. L.; DAVIS, H. C. 1963. Rearing of bivalve mollusks. In: *Advances in Marine Biology*, vol. 1. Academic Press, London, pp. 1-136.

MALLET, A. L.; HALEY, L. E. 1983a. Growth and survival of pure population matings and crosses in the Atlantic oyster. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 40: 948-954.

MALLET, A. L.; HALEY, L. E. 1983b. Effects of inbreeding on larval and spat performance in the American oyster. *Aquaculture*, 33: 229-235.

MERCALDO, R. S.; RHODES, E. W. 1982. Influence of reduced salinity on the Atlantic Bay scallop *Argopecten irradians* (Lamark) at various temperatures. *Journal of Shellfish Research*, 2: 177-181.

MIRANDA, M. B. B.; GUZENSKI, J. 1999. Cultivo larval da ostra de mangue, *Crassostrea rhizophorae* (Guilding, 1828), em diferentes condições de temperatura, salinidade e densidade. *Arquivos de Ciências do Mar*, 32: 73-84.

MUNIZ, E.C.M. 1983. Manual de Maricultura: Projeto Cabo Frio. Brasília. Ministério da Marinha. 40p.

NELL, J. A.; GIBBS, P. J. 1986. Salinity tolerance and absorption of L-methionine by some Australian bivalve molluscs. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 37: 721-727.

NELL, J. A., HOLLIDAY, J. E. 1988. Effects of salinity on the growth and survival of Sydney rock oyster (*Saccostrea commercialis*) and Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae and spat. *Aquaculture*, 68: 39-44.

NEWKIRK, G. F.; WAUGH, D. L.; HALEY, L. E. 1977. Genetics and larval tolerance to reduced salinities in two populaions of oysters, *Crassostrea virginica*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 34: 383-387.

OLIVEIRA, J. M. 1998. Efeitos da densidade populacional e renovação da água no crescimento e sobrevivência larval da ostra *Crassostrea gigas* (THUNBERG, 1793). Dissertação apresentada ao Mestrado em Aquicultura - Programa de Pós-Graduação em Aquicultura, Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre. 122p.

PAPARO, A. A. 1981. Acclimation/reacclimation to salinity conditions and its relationship to the transport of suspended microspheres on the gill of *Mytillus edulis*. *Comp. Biochem. Physiol*, 69: 417-421.

PAPARO, A. A.; DEAN, R. 1982. Tolerance to test salinities as a function of average rate of transport. *Comp. Biochem. Physiol*, 72A: 583-585.

PAUL, J. D. 1980. Salinity-temperature relationship in queen scallop *Chlamys opercularis*. *Marine Biology*, 56: 295-300.

POLI, C.R. 1994. O cultivo de *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1795) no Sul do Brasil. Tese (Professor Titular) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis: UFSC. 114p.

PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G. 2003a. Nutritional value of fresh and concentrated algal diets for larval and juvenile Pacific oysters (*Crassostrea gigas*). *Aquaculture*, 221: 491-505.

PONIS, E.; ROBERT, R.; PARISI, G.; TREDICI, M. 2003b. Assessment of the performance of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) larvae fed with fresh and preserved *Pavlova lutheri* concentrates. *Aquaculture International*, 11: 69–79.

QUAYLE, D.B., NEWKIRK, G.F., 1989. Farming Bivalve Molluscs: Methods for Study and Development. *Advances in World Aquaculture*, Vol. 1. The World Aquaculture Society In Assoc. with The International Development Research Centre. The World Aquaculture Soc., Baton Rouge, LA, 294 pp.

RAMOS, M.I.S.; NASCIMENTO, I.A.; SILVA, J.L. 1986. The comparative growth survival of Pacific oyster (*Crassostrea gigas* Thunberg, *C. gigas* var. Kumamoto) and mangrove oyster (*C. rhizophorae*) in todos os Santos Bay, Brazil. *Ciência e Cultura*, 34 (9); p. 1604 – 1615.

RAWSON, P. D.; HILBISH, T. J. 1990. Heritability of juvenile growth for the hard clam *Mercenaria mercenaria*. *Marine Biology*, 105: 429-436.

ROJAS, L. M.; VELEZ, A.; AZUAJE, O. 1988. Efecto individual y combinado de la densidad larval y la ración de alimento sobre la supervivencia y crecimiento de la vieira, *Pecten ziczac*. *Boletín del Instituto de Oceanografía. Venezuela, Universidad de Oriente*, 27 (1-2): 57-62.

ROLDÁN-CARRILLO, L. M.; MAEDA-MARTÍNEZ, A. N.; MASSÓ-ROJAS, A.; SICARD-GONZÁLEZ, M. T. 2005. Salinity tolerance and resistance of the Pacific Lion's Paw Scallop *Nodipecten subnodosus* and the relationship with species distribution and density in a coastal lagoon. Journal of Shellfish Research. Vol. 24, n° 2:353-361.

SIGNORET-BRAILOVSKY, G.; MAEDA-MARTINEZ, A. N.; REYNOSO-GRANADOS, T.; SOTO-GALERA, E.; MONSALVI-SPENDER, P.; VALLE-MEZA, G. 1996. Salinity tolerance of the Catarina scallop *Argopecten ventricosus-circularis* (Sowerby II, 1842). Journal of Shellfish Research, 15: 623-626.

SOUTHGATE, P. C., ITO, M. 1998. Evaluation of a partial flow-through culture technique for pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) larvae. Aquacultural Engineering 18 : 1–7.

SUDRAJAT, A. 1990. Studies on the reproductive biology and culture of the rock oyster, *Saccostrea cucullata* (Born) and slipper oyster, *Crassostrea iredalei* (Faustino). Ph.D. Thesis, University College of Swansea.

TAN, S. H.; WONG, T. M. 1996. Effect of salinity on hatching, larval growth, survival and settling in the tropical oyster *Crassostrea belcheri* (Sowerby). Aquaculture, 145: 129-139.

TAYLOR, J. J.; SOUTHGATE, P. C.; ROSE, R. A. 2004. Effects of salinity on growth and survival of silver-lip pearl oyster, *Pinctada maxima*, spat. Journal of Shellfish Research, vol 23, n° 2, 375-377.

TETTELBACH, S.T., RHODES, E.W., 1981. Combined effects of temperature and salinity on embryos and larvae of the northern bay scallop, *Argopecten irradians irradians*. Marine Biology, p. 249–256.

THOMPSON, P. A.; GUO, M.; HARRISON, P. J. 1996. Nutritional value of diets that vary in fatty acid composition for larval Pacific oysters ( *Crassostrea gigas*). Aquaculture, 143: 379-391.

UFSC. 1997. Relatório sobre o cultivo de ostras. Departamento de Aquicultura, Laboratório de Cultivo de Moluscos Bivalves, Florianópolis – SC.

WANG, Y.; YOU, Z.; ZHANG, J. ZHU, X. 1992. A preliminary study on the artificial rearing density of larval *Moerella iridescens* (Benson). Journal of the Zhejiang College of Fisheries. Zhejiang Shuichan Xueyuan Xuebao, 11: 110-115.

## 7. ANEXOS

### 7.1. Normas para publicação no periódico AQUACULTURE RESEARCH

**Edited by:**

Ronald W. Hardy and S.J. de Groot

**Print ISSN:** 1355-557X**Online ISSN:** 1365-2109**Frequency:** Sixteen times a year**Current Volume:** 38 / 2007**ISI Journal Citation Reports® Ranking:** 2005: 26/41 (Fisheries)**Impact Factor:** 0.746**TopAuthor Guidelines**

**Submission.** One original and three copies of each typescript should be submitted to either of the editors:

Dr S J de Groot, PO Box 97, 2080 AB Santpoort-zuid, the Netherlands.  
Dr Ronald W Hardy, Director, UI Hagerman Fish Culture Experiment Station, 3059 F National Fish Hatchery Road, Hagerman, ID 83332, USA.

Authors from the Americas, Japan, China, S E Asia and Australia may submit to Dr Hardy. Authors from all other countries may submit to Dr de Groot.

A disk should accompany the final version of the manuscript. Authors are requested to use an IBM-compatible system (see below for more details). All manuscripts must be accompanied by a valid email address.

Papers are accepted on the understanding that they have not been and will not be published elsewhere. Copyright of accepted manuscripts and all published material becomes the property of the Journal.

Online production tracking is available for your article through Blackwell's Author Services.

Author Services enables authors to track their article - once it has been accepted - through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production so they don't need to

contact the production editor to check on progress. Visit [www.blackwellpublishing.com/bauthor](http://www.blackwellpublishing.com/bauthor) for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

**Preparation of the manuscript.** All sections of the typescript should be on one side of A4 paper, double-spaced and with 30 mm margins. Articles are accepted for publication only at the discretion of the Editor(s). Authors will receive prompt receipt of their paper and a decision will be reached within 3 months of receipt. A manuscript should consist of the following sections:

**Title page.** This should include:

the full title of the paper

the full names of all the authors

the name(s) and address(es) of the institution(s) at which the work was carried out (the present address of the authors, if different from the above, should appear in a footnote)

the name, address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author to whom all correspondence and proofs should be sent

a suggested running title of not more than 50 characters, including spaces

four to six keywords for indexing purposes

**Main text.** Generally, all papers should be divided into the following sections and appear in the order: (1) Abstract or Summary, not exceeding 150-200 words, (2) Introduction, (3) Materials and Methods, (4) Results, (5) Discussion, (6) Acknowledgments, (7) References, (8) Figure legends, (9) Tables, (10) Figures.

The Results and Discussion sections may be combined and may contain subheadings. The Materials and Methods section should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. Trade names should be capitalized and the manufacturer's name and address given.

All pages must be numbered consecutively from the title page, and include the acknowledgments, references and figure legends, which should be submitted on separate sheets following the main text. The preferred position of tables and figures in the text should be indicated in the left-hand margin.

**Units and spellings.** Systeme International (SI) units should be used. The salinity of sea water should be given as gL<sup>-1</sup>. Use the form gL<sup>-1</sup> not g/ml. Avoid the use of g per 100 g, for example in food composition, use g kg<sup>-1</sup>. If other units are used, these should be defined on first appearance in terms of SI units, e.g. mmHg. Spelling should conform to that used in the *Concise Oxford Dictionary* published by Oxford University Press. Abbreviations of chemical and other names should be defined when first mentioned in the text unless they are commonly used and internationally known and accepted.



**Scientific names and statistics.** Complete scientific names, including the authority with correct taxonomic disposition, should be given when organisms are first mentioned in the text and in tables, figures and key words together with authorities in brackets, e.g. 'rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum)' but 'Atlantic salmon *Salmo salar* L.' without brackets. For further information see American Fisheries Society Special Publication No. 20, *A List of Common and Scientific Names of Fishes from the United States and Canada*.

Carry out and describe all appropriate statistical analyses.

**References (Harvard style).** References should be cited in the text by author and date, e.g. Lie & Hemre (1990). Joint authors should be referred to in full at the first mention and thereafter by *et al.* if there are more than two, e.g. Hemre *et al.* (1990).

More than one paper from the same author(s) in the same year must be identified by the letters a, b, c, etc. placed after the year of publication. Listings of references in the text should be chronological. At the end of the paper, references should be listed alphabetically according to the first named author. The full titles of papers, chapters and books should be given, with the first and last page numbers.

Chapman D.W. (1971) Production. In: *Methods of the Assessment of Fish Production in Freshwater* (ed. by W.S. Ricker), pp. 199-214. Blackwell Scientific Publications Ltd, Oxford.

Utting, S.D. (1986) A preliminary study on growth of *Crassostrea gigas* larvae and spat in relation to dietary protein. *Aquaculture* **56**, 123-128.

Authors are responsible for the accuracy of their references. References should only be cited as 'in press' if they have been accepted for publication. Manuscripts in preparation, unpublished reports and reports not readily available should not be cited. Personal communications should be cited as such in the text.

It is the authors' responsibility to obtain permission from colleagues to include their work as a personal communication. A letter of permission should accompany the manuscript.

**Illustrations and tables.** These should be referred to in the text as figures using Arabic numbers, e.g. Fig.1, Fig.2 etc. in order of appearance. Three copies of each figure should be submitted and each figure should be marked lightly on the back with its appropriate number, together with the name(s) of the author(s) and the title of the paper. Where there is doubt as to the orientation of an illustration, the top should be marked with an arrow.

Photographs and photomicrographs should be unmounted glossy prints and should not be retouched. Labelling, including scale bars if necessary, should be clearly indicated on an overlay or photocopy. Magnifications should be included in the legend.

It is the policy of *Aquaculture Research* for authors to pay the full cost for the reproduction of their colour artwork. Therefore, please note that if there is colour artwork in your manuscript when it is accepted for publication, Blackwell Publishing require you to complete and return a colour work agreement form before your paper can be published. This form can be downloaded as a pdf from the internet. The web address for the form is: [http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN\\_Sub2000\\_X\\_CoW.pdf](http://www.blackwellpublishing.com/pdf/SN_Sub2000_X_CoW.pdf)

If you are unable to access the internet, or are unable to download the form, please contact the Production Editor [are@oxon.blackwellpublishing.com](mailto:are@oxon.blackwellpublishing.com), and they will be able to email or FAX a form to you.

**Any article received by Blackwell Publishing with colour work will not be published until the form has been returned.**

Line drawings should be on separate sheets of white paper in black indelible ink (dot matrix illustrations are not permitted); lettering should be on an overlay or photocopy and should be no less than 4 mm high for a 50% reduction. Please note, each figure should have a separate legend; these should be grouped on a separate page at the end of the manuscript. All symbols and abbreviations should be clearly explained.

Tables should be self-explanatory and include only essential data. Each table must be typewritten on a separate sheet and should be numbered consecutively with Arabic numerals, e.g. Table 1, and given a short caption. No vertical rules should be used. Units should appear in parentheses in the column headings and not in the body of the table. All abbreviations should be defined in a footnote.

All tables and figures that are reproduced from a previously published source must be accompanied by a letter of permission from the Publisher or copyright owner.

Please send us digital versions of your figures. These should be supplied as eps or tif files only. See <http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/illustration.asp> for further details.

Avoid using tints if possible; if they are essential to the understanding of the figure, try to make them coarse.

In the full-text online edition of the Journal, figure legends may be truncated in abbreviated links to the full-screen version. Therefore, the first 100 characters of any legend should inform the reader of key aspects of the figure.

**Acknowledgments.** These should be brief and must include references to sources of financial and logistical support.

**Short Communications.** These should differ from full papers on the basis of scope or completeness, rather than quality of research. They may report significant new data arising from problems with narrow, well defined limits, or important findings that warrant rapid publication before broader studies are complete. Their text should neither exceed 1500 words (approximately six pages of typescript) nor be divided up into conventional sections. When submitting Short Communications, authors should make it clear that their work is to be treated as such.

**Disks.** The Journal encourages submission of accepted manuscripts on disk. These should be IBM-compatible. An accurate hard copy must accompany each disk, together with details of the type of computer used, the software employed and the disk system if known. *Do not justify.* Particular attention should be taken to ensure that any articles submitted in this form adhere *exactly* to the journal style in all respects. Further details can be obtained from the Publisher; the Editor(s) will supply 'disk submission' forms on acceptance of a manuscript. Disks will not be returned to the author.

**Copyright.** It is a condition of publication that authors grant Blackwell Publishing Ltd the exclusive licence to publish all articles including abstracts. Papers will not be passed to the publisher for production unless the exclusive licence to publish has been granted. To assist authors an exclusive licence form will be supplied by the editorial office. Alternatively authors may like to download a copy of the form [click here](#). Correspondence to the Journal is accepted on the understanding that the contributing author licences the publisher to publish the letter as part of the journal or separately from it, in the exercise of any subsidiary rights relating to the journal and its contents.

**Page proofs and reprints.** The corresponding author will receive an email alert containing a link to a web site. A working email address must therefore be provided for the corresponding author. The proof can be downloaded as a PDF (portable document format) file from this site. Acrobat Reader will be required in order to read this file. This software can be downloaded (free of charge) from the following web site: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html> This will enable the file to be opened, read on screen and printed out in order for any corrections to be added. Further instructions will be sent with the proof. Hard copy proofs will be posted if no email address is available. Only

typographical errors can be corrected at this stage. Excessive changes made by the author in the proofs, excluding typesetting errors, will be charged separately.

**Offprints.** A PDF offprint of the online published article will be provided free of charge to the corresponding author, and may be distributed subject to the Publisher's terms and conditions. Paper offprints of the printed published article may be purchased if ordered via the method stipulated on the instructions that will accompany the proofs. Printed offprints are posted to the correspondence address given for the paper unless a different address is specified when ordered. Note that it is not uncommon for printed offprints to take up to eight weeks to arrive after publication of the journal. Additional paper offprints may be ordered online. Please click on the following link, fill in the necessary details and ensure that you type information in all of the required fields: [http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE\\_ID=bw&FID=USER\\_HOME\\_PG](http://offprint.cosprinters.com/cos/bw/main.jsp?SITE_ID=bw&FID=USER_HOME_PG) If you have any queries about offprints please email [offprint@cosprinters.com](mailto:offprint@cosprinters.com)

**Author material archive policy.** Please note that unless specifically requested, **Blackwell Publishing will dispose of all hardcopy or electronic material submitted two issues after publication.** If you require the return of any material submitted, please inform the editorial office or production editor as soon as possible if you have not yet done so.