

## **AGRADECIMENTOS**

Ao IMAR – Instituto do Mar – Centro Interdisciplinar de Coimbra, que desde a primeira hora me permitiu desenvolver trabalho numa área que muito me entusiasma.

Ao meu orientador Professor Doutor Miguel Pardal, cujo exemplo de rigor e exigência tanto nos motiva, pela confiança e incentivo sempre demonstrados.

Ao meu orientador Professor Doutor Paulo Maranhão, cujo trabalho de campo foi essencial para a realização desta tese, guia imprescindível nas minhas idas a Peniche, por toda a disponibilidade e acompanhamento.

Aos meus colegas do IMAR – em particular à Sónia Cotrim – e de Mestrado, pelo ambiente de equipa proporcionado.

Aos meus amigos e à minha família, pelo apoio constante e indispensável.



## RESUMO

*Littorina neritoides* (L. 1758) é um gastrópode comum na zona intertidal que vive em fendas na costa rochosa. Com o objectivo de preencher a lacuna na literatura relativa à dinâmica populacional desta espécie no Sul da Europa, foram monitorizadas, na costa Oeste de Portugal, entre Abril de 2004 e Julho de 2005, duas populações.

Para estudar o efeito de uma Estação de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) na dinâmica populacional e produção secundária de *L. neritoides* seleccionaram-se duas áreas semelhantes e próximas, de forma a permitir comparações. Foram analisadas diversas variáveis ambientais, bem como a densidade, biomassa, estrutura populacional e produção secundária desta espécie no local de referência e no perturbado.

Os resultados revelam uma abundância superior na área vizinha à ETAR, o que pode ser explicado pela ocorrência de um recrutamento massivo no nível inferior desse local (maior quantidade de nutrientes na água do mar aumenta o crescimento das algas na costa rochosa, o que estimula a colonização bentónica). No entanto, uma elevada mortalidade nesta área aproxima os valores de densidade nos níveis superiores de ambas as zonas.

Sugere-se que o ambiente de stress químico provocado pelas descargas da ETAR possa ser responsável por esta mortalidade elevada. Tal justifica, também, as densidades observadas nos níveis superiores (inferiores às esperadas), bem como o facto dos adultos crescerem menos ou possuírem em média menor tempo de vida do que na área de referência.



## **ABSTRACT**

*Littorina neritoides* (L. 1758) is a common intertidal gastropod that lives in crevices in the rocky shore. Aiming to fill the gap in the literature referring to population dynamics of this species in southern European coasts, between April 2004 and July 2005, two populations in the western coast of Portugal were monitored.

In order to assess the effect of a wastewater treatment plant discharging into the coast on *L. neritoides* population dynamics and secondary production, two close and similar shores were chosen to allow comparisons. Environmental data and *L. neritoides* density, biomass, population structure and annual growth production on the undisturbed (used as reference site) and on the disturbed/polluted shore were estimated.

The results show that abundance is higher in the disturbed area, explained by a massive settlement (more nutrients in the water produce more algae in the rocky surface enhancing benthic recruitment) in the lower level of the shore. However, a high mortality in this area approximates the density values of the upper levels in both shores. It is hypothesized that a stressing chemical environment near the effluent of the wastewater treatment plant may cause this mortality. Densities in the upper levels of the disturbed shore are lower than expected and the adults seem to grow less or have a shorter life span when compared with the reference shore.



Capítulo 1 – Introdução	
1.1. Introdução geral	2
1.2. <i>Littorina neritoides</i> (L.)	4
1.3. Impacto das actividades humanas no Litoral: Estações de Tratamento de Águas Residuais	9
1.4. Objectivos	11
Capítulo 2 – Metodologia	
2.1. Área de estudo	14
2.2. Campanhas de amostragem	14
2.3. Procedimento laboratorial	16
2.4. Análise dos dados	17
Capítulo 3 – Resultados	
3.1. Variáveis ambientais	20
3.2. Padrões de distribuição e abundância	21
3.2.1. Distribuição de acordo com as variáveis ambientais	23
3.3. Estrutura da população e produção	25
Capítulo 4 – Discussão	
4.1. Variáveis ambientais	30
4.2. Padrões de distribuição e abundância	31
4.3. Estrutura da população e produção	34
4.4. Considerações finais	37
Referências bibliográficas	40
Anexo	





**CAPÍTULO 1** \_\_\_\_\_ **INTRODUÇÃO**

## 1.1. INTRODUÇÃO GERAL

Os oceanos apresentam uma grande diversidade de habitats. Desde as costas rochosas até aos fundos oceânicos, as condições ambientais são muito variáveis, o que permite que diferentes organismos se adaptem e sobrevivam. Na transição entre a terra e o mar situa-se a zona intertidal, caracterizada pela forte influência das marés (Sumich & Morrissey, 2004). Os organismos que aí habitam, tal como todas as espécies marinhas, encontram-se adaptados a um conjunto de condições ambientais específicas, determinadas pela distância ao nível do mar, que caracterizam um andar (Saldanha, 1997).

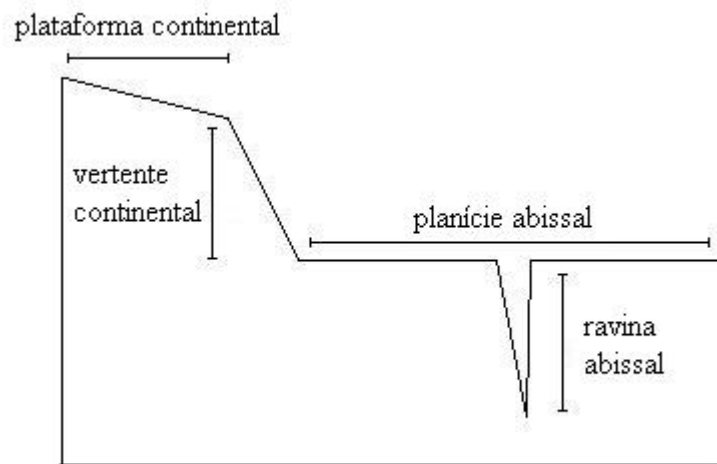


Figura 1 – Topografia esquemática do fundo dos oceanos

Sobre a plataforma continental (Fig. 1) apresentam-se quatro andares: supralitoral, mediolitoral, infralitoral e circalitoral, que constituem o sistema litoral ou fital (Saldanha, 1997). Esta distribuição dos organismos por andares, a que se dá o nome de zonação, observa-se nos ecossistemas marinhos de todo o mundo. Mas porque razão se dispõem as espécies desta forma? Dada a influência das marés na zona intertidal, é lógico supor-se que esta zonação seja determinada por factores relacionados com o tempo de emersão: temperatura atmosférica, efeitos da radiação solar e humidade. Tal

parece confirmar-se, uma vez que os indivíduos que habitam os andares superiores apresentam maior tolerância a estes factores de stress (Little & Kitching, 1996).

Underwood (1972) estudou a reacção de gastrópodes ao ciclo tidal: a maioria colocou-se no modelo experimental numa posição semelhante à que se encontra na costa rochosa. No entanto, *L. obtusana* comportou-se de forma estranha: subiu para o topo da costa artificial, onde ficou até morrer de dessecação. Porém, quando algas fucóides foram introduzidas no modelo os gastrópodes responderam, dirigindo-se sempre na sua direcção. A atracção algas – gastrópodes era essencial no mecanismo de zonação (Little & Kitching, 1996).

Supõe-se, actualmente, que o limite superior na distribuição vertical dos organismos intertidais é determinado por factores físicos (humidade, radiação solar), sendo as interacções biológicas (competição, predação) responsáveis pelo limite inferior (Pinet, 2000).

Cada andar assim definido é caracterizado pela presença de determinadas espécies adaptadas a condições ambientais particulares. Na costa rochosa, o andar supralitoral, na fronteira entre o domínio terrestre e o marinho, é distinguido pela presença de *L. neritoides*, cianofíceas (algas azuis microscópicas), o líquene negro *Verrucaria maura* e o crustáceo isópode *Ligia oceanica*. Não apresenta uma diversidade elevada, pois poucas são as espécies capazes de se adaptar às condições ambientais aí sentidas. Normalmente é apenas salpicado por gotas, podendo ser coberto por água do mar em altura de marés vivas (Saldanha, 1997).

O ciclo tidal, as variações de temperatura e o hidrodinamismo são alguns dos factores ambientais a que *Littorina neritoides* precisa de se adaptar para sobreviver. Tem de prevenir a perda de água por evaporação, manter o balanço térmico, defender-se

contra a acção das ondas, sem esquecer as trocas gasosas e o equilíbrio osmótico. Tudo isto não descurando a alimentação e a reprodução (Nybakken, 2001).

### 1.2. *LITTORINA NERITOIDES* (L.)

Na zona de transição entre a terra e o mar, em fendas no substrato rochoso, é possível observar-se um pequeno molusco gastrópode chamado *Littorina neritoides* (L. 1758) (= *Melaraphe neritoides*).

Esta espécie é a mais pequena da família Littorinidae (em média, 3-5 mm) e apresenta concha lisa mais alta que larga, com vértice pontiagudo, de cor cinzenta ou negra (Saldanha, 1997).

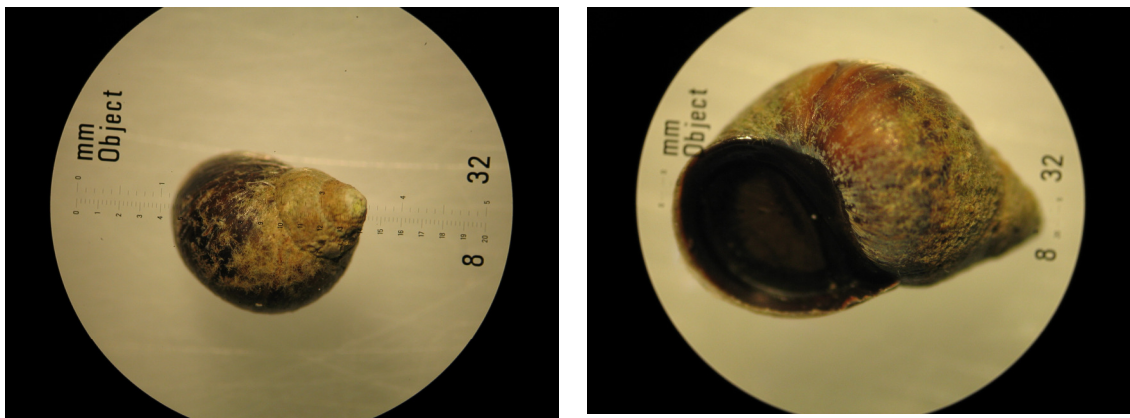


Figura 2 – *Littorina neritoides*

*Littorina neritoides* é um dos mesogastrópodes mais abundantes na zona intertidal e tem sido objecto de muitos estudos. No entanto, poucos abordam a estrutura populacional, o crescimento e a produção secundária (Tabela I).

Tabela I – Estudos efectuados sobre *Littorina neritoides*

<b>Ano</b>	<b>Autor</b>	<b>Local</b>	<b>Assunto</b>
1933	Patanè	Itália	Comportamento
1935	Lebour	Inglaterra	Reprodução
1941	Lysaght	Inglaterra	Biologia e parasitas
1947	Lebour	Inglaterra	Reprodução
1948	Evans	Inglaterra	Fisiologia
1961	Fraenkel	França	Fisiologia
1968	Palant & Fishelson	Israel	Dinâmica populacional
1975	Holland <i>et al.</i>	Inglaterra	Bioquímica
1976	Daguzan	França	Crescimento e longevidade
1976	Daguzan	França	Ecologia
1977	Fretter & Manly	Inglaterra	Colonização
1978	Raffaelli & Hughes	País de Gales	Efeito de fendas na população
1980	Hughes & Roberts	País de Gales	Reprodução
1980	Hughes & Roberts	País de Gales	Crescimento e reprodução
1981	Hughes & Roberts	País de Gales	Dinâmica populacional
1982	Thiriot-Quiéveux & Ayraud	França	Genética
1983	Davey	Inglaterra	Parasitas
1984	Bosh & Moreno	Espanha	Crescimento
1985	Bosh & Moreno	Espanha	Estrutura populacional
1985	Nuwayhid <i>et al.</i>	Líbano	Comportamento
1986	Bosh & Moreno	Espanha	Distribuição espacial
1986	Knight & Ward	Inglaterra	Genética
1987	Noy <i>et al.</i>	Israel	Genética
1987	Lavie & Nevo	Israel	Genética
1987	Nevo <i>et al.</i>	Israel	Genética
1988	Vitturi <i>et al.</i>	Itália	Genética
1989	Grech & Schembri	Malta	Comportamento
1989	Nevo & Lavie	Israel	Genética
1990	Kronberg	Alemanha	Fisiologia
1993	Myers & McGrath	Irlanda	Dinâmica populacional
1993	Nevo	Israel	Genética
1997	McGrath	Irlanda	Dinâmica populacional
1998	Medeiros <i>et al.</i>		Bioquímica
2000	Cronin <i>et al.</i>	Irlanda	Ciclo reprodutivo
2002	Colomba <i>et al.</i>	Itália	Genética
2003	Cronin <i>et al.</i>	Irlanda	Ciclo reprodutivo
2004	Stafford & Davies	Inglaterra	Comportamento
2005	Stafford & Davies	Inglaterra	Comportamento
2005	Stafford & Davies	Inglaterra	Ecologia

Este gastrópode alimenta-se de algas e líquenes presentes na superfície rochosa (Stafford & Davies, 2005b) e refugia-se em fendas onde se protege da acção das ondas, predação e/ou dessecação (Fretter & Manly, 1977; Raffaelli & Hughes, 1978). Hughes

& Roberts (1981) relacionaram o aumento do número de fendas no substrato com um incremento da densidade local, o que sugere a preferência de *L. neritoides* por este micro-habitat. Outra adaptação comportamental é a formação de densos agregados de indivíduos, frequentemente associados a falhas na rocha. Este comportamento, que não se julga dever à protecção contra a dessecação (Stafford & Davies, 2004), pode ser resposta à acção das ondas, predação ou reprodução. Os indivíduos desta espécie conseguem sobreviver até 5 meses à dessecação (Patanè, 1933), retomando a actividade em apenas alguns minutos após serem recolocados em água do mar.

*Littorina neritoides* foi considerada vivípara até 1935, quando Linke e Lebour provaram a produção de cápsulas planctónicas (Fig. 3), com um único ovo que se desenvolve numa velígera<sup>1</sup> de vida livre (Lebour, 1935).



Figura 3 – concha e larva velígera de *Littorina neritoides* (Modificado de Lebour, 1935)

As fêmeas só parecem largar as cápsulas quando estão submersas. Foram encontrados indivíduos com cápsulas prontas a ser libertadas, em áreas onde a maré só chegaria em 2-3 horas. Assim, parece que a formação e a libertação das cápsulas não são processos contínuos, podendo haver uma pausa entre eles (Fretter & Manly, 1977).

---

<sup>1</sup> A larva planctónica dos gastrópodes é caracterizada pela presença de um véu ciliado que envolve a boca: o vélum ou véu, de onde vem o seu nome de larva velígera (do latim *velum*, véu, e *gerer*, levar). Inicialmente utilizado para a larva se deslocar, evoluiu para órgão colector de plâncton. A fase planctónica do desenvolvimento destas larvas pode então ser prolongada até que encontrem um meio ambiente favorável à sua metamorfose.

Lysaght (1941) fez notar que a maturidade dos indivíduos e a libertação das cápsulas parecem coincidentes com o período de tempestades de Inverno (Dezembro – Fevereiro). Das cinco amostras de plâncton que recolheu com mais de 50 cápsulas, quatro coincidiram com marés vivas, e a excepção continha cápsulas com idade suficiente para terem sido libertadas na maré alta anterior. Também na costa irlandesa os indivíduos parecem atingir a maturidade durante a mesma estação do ano, especialmente nas zonas menos expostas (Cronin *et al.*, 2000). Efectivamente, seria benéfico para uma espécie supralitoral produzir e libertar cápsulas na altura em que as marés são de maior amplitude.

Alguns autores (Lebour, 1935; Palant & Fishelson, 1968) referem uma dispersão das fêmeas na altura da libertação das cápsulas. Contudo, esta hipótese nunca foi provada. Pelo contrário, Lysaght (1941), nas suas experiências, demonstrou que existe uma tendência para os gastrópodes se dirigirem para níveis superiores, sendo muito poucos os que se deslocam na direcção contrária. Além disso, seria de esperar uma tendência de dispersão maior nas fêmeas do que nos machos, o que não parece acontecer.

Não havendo dispersão para níveis inferiores, a libertação das cápsulas vai depender da fase da lua (marés), direcção e força do vento e estado do mar. Parece também ser influenciada pela localização geográfica, tendo sido observado por Hughes & Roberts (1980b) uma diminuição no número de meses em que ocorre a formação e libertação de cápsulas em ambos os extremos latitudinais. Isto pode ser explicado pela influência da temperatura do ar e da água do mar no ciclo reprodutor, sendo necessário um aumento de temperatura para a reprodução ter início (Palant & Fishelson, 1968).

A dispersão das larvas no plâncton deve estar relacionada com a qualidade dos micro-habitats presentes em cada costa, o que varia de forma imprevisível no tempo e no espaço (Hughes & Roberts, 1981). Tal dá vantagem a este tipo de reprodução: sendo

a dispersão feita em várias direcções, a probabilidade de que sejam encontrados locais favoráveis aumenta.

As larvas planctónicas acabam por colonizar o nível inferior da costa rochosa. O sucesso depende das condições para a sobrevivência das larvas na coluna de água e dos juvenis na costa rochosa (Little & Kitching, 1996). O local escolhido para a colonização deve possuir características que permitam a transição dos gastrópodes do plâncton para uma vida semi-terrestre (Fretter & Manly, 1977). Os indivíduos mantêm-se no local que colonizaram até atingirem cerca de 1mm de comprimento, alimentando-se de algas. Posteriormente, começam a deslocar-se para níveis superiores, exibindo geotaxia negativa (Fretter & Manly, 1977). Estes mesmos autores observaram uma drástica diminuição no número de juvenis 24 horas após a colonização (350 ind.m<sup>-2</sup> para 51 ind.m<sup>-2</sup>; 405 ind.m<sup>-2</sup> para 38 ind.m<sup>-2</sup>), encontrando-se protegidos em fendas os que permaneceram no local. Parte deste decréscimo pode dever-se à deslocação para níveis superiores dos indivíduos de maiores dimensões. A densidade é, então, superior no nível mais perto do mar – devido à presença de juvenis – e diminui nos níveis superiores (Bosh & Moreno, 1986).

A dispersão de juvenis para níveis superiores causa o gradiente de tamanho característico da espécie (Chen & Richardson, 1987): indivíduos de maiores dimensões à medida que se sobe na costa (Lysaght, 1941; Bosh & Moreno, 1986). Este gradiente de tamanho relacionado com a altura tidal pode ser importante, assegurando uma maior sobrevivência da espécie. Indivíduos de diferentes dimensões têm tolerâncias variáveis a factores de stress como perda de água ou temperatura (Newel, 1979).

As taxas de crescimento diminuem com a idade, sendo muito baixas em indivíduos com mais de 6mm (Lysaght, 1941). As taxas de mortalidade diminuem



progressivamente no desenrolar da fase juvenil, sendo mais ou menos constante nos adultos (Hughes & Roberts, 1981).

### 1.3. IMPACTO DAS ACTIVIDADES HUMANAS NO LITORAL: ESTAÇÕES DE TRATAMENTO DE ÁGUAS RESIDUAIS

O Litoral constitui um quarto do território nacional, e é onde está fixada a maioria da população. Nos censos de 2001 os NUT litorais abarcavam 80% da população (Fig. 4). Estes números explicam a enorme pressão humana a que esta área – e, consequentemente, as comunidades marinhas que aí habitam – se acham sujeitas.

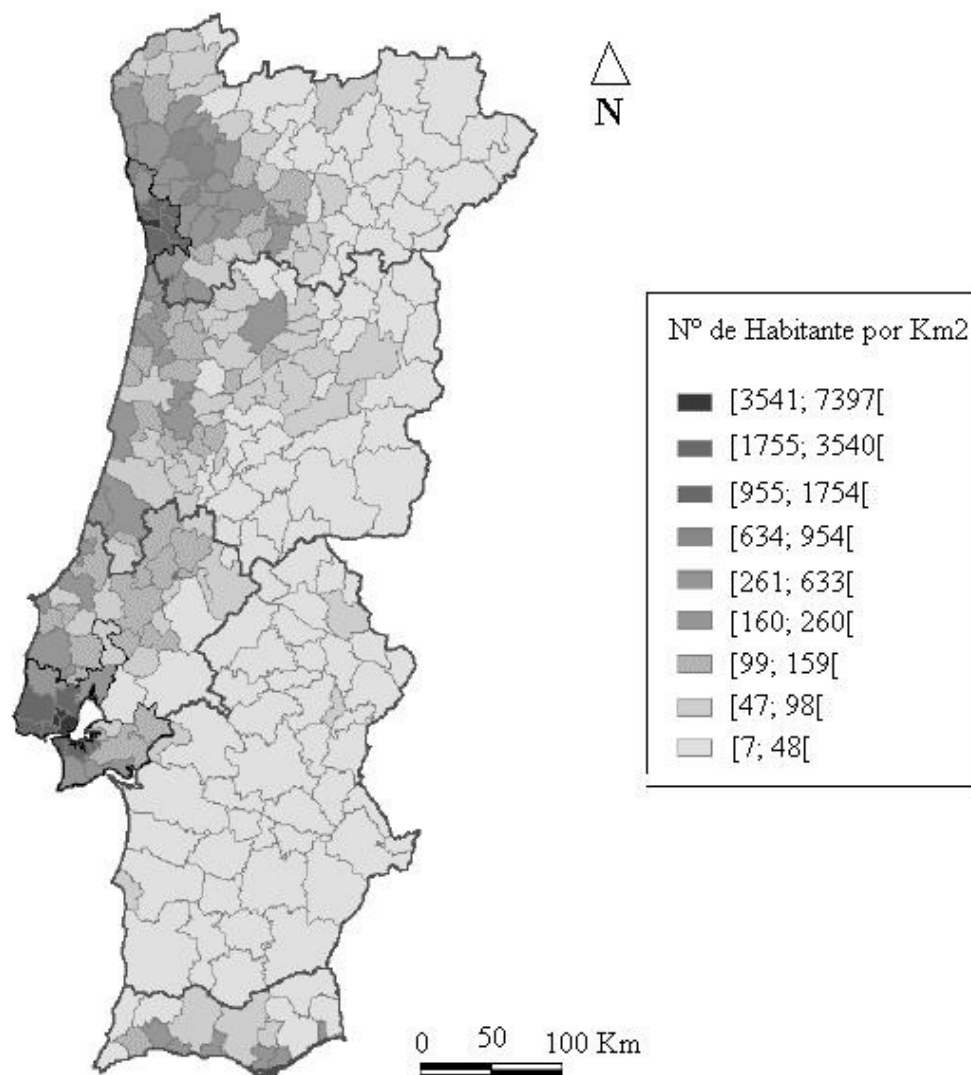


Figura 4 – Densidade populacional em Portugal continental (Censos 2001)

Segundo o Instituto da Água, o principal impacto antropogénico no litoral português é o lançamento de efluentes domésticos e industriais para o mar, muitas vezes sem qualquer tipo de tratamento. No que respeita aos resíduos domésticos estes são uma mistura de matéria orgânica, nutrientes (como nitrato e fosfato) e microorganismos (vírus, bactérias). Os efluentes industriais variam consoante o tipo de indústria e o tratamento efectuado antes das descargas, mas é geralmente rico em metais pesados e compostos orgânicos sintéticos.

As Estações de Tratamento de Águas Residuais (ETAR) são a resposta ao necessário tratamento dos efluentes domésticos urbanos, antes de serem lançados para o mar. A acção de uma ETAR – explicada de forma muito simplificada – pode ser dividida em quatro etapas: tratamento preliminar, primário, secundário e terciário. O tratamento preliminar retira os sólidos e flutuantes de maiores dimensões, bem como areias e gorduras, com o objectivo de impedir que estes danifiquem o equipamento. O tratamento primário remove sólidos em suspensão e matérias flutuantes através de processos químicos (neutralização; coagulação/floculação) e físicos (flotação; sedimentação; filtração). O tratamento secundário utiliza processos biológicos (bactérias) e químicos para eliminar os materiais em suspensão que o tratamento primário não eliminou. Por fim, o tratamento terciário subtrai elementos nocivos ao meio ambiente, como bactérias e nutrientes (McKinney & Schoch, 1998).

Contudo, muitas das ETAR no nosso país têm tido problemas de funcionamento, ou por má gestão ou por inadequação dos tratamentos face aos efluentes recebidos. Segundo relatório do Ministério do Ambiente, do Ordenamento do Território e do Desenvolvimento Regional “Campanha de Inspeções a ETAR com Descarga em Zonas Balneares Costeiras (2004) apenas em 33% das inspeções não foram registadas quaisquer tipo de infracções.

#### **1.4. OBJECTIVOS**

O tratamento das águas residuais é uma necessidade incontornável nos dias de hoje. Todavia, nem sempre se tem sabido avaliar os custos ambientais do mau funcionamento destas Estações (ETAR). Analisar, de forma coerente e sistematizada, o verdadeiro impacto ambiental desta perturbação nas comunidades marinhas é o objectivo mais geral desta dissertação. Neste sentido, foram recolhidas amostras de *L. neritoides* em duas áreas (uma de referência, no Porto da Areia Sul, e outra vizinha à ETAR) com o intuito de estudar a estrutura populacional, a dinâmica populacional e a produção secundária desta espécie na costa portuguesa e examinar o impacto das descargas da ETAR naquela população.



**CAPÍTULO 2** \_\_\_\_\_ **METODOLOGIA**

## 2.1 ÁREA DE ESTUDO

O Concelho de Peniche tem uma área de 76,9 Km<sup>2</sup> e 27 315 habitantes (Censos 2001). As suas principais actividades são a pesca, a indústria (transformação e tratamento do pescado) e o turismo.



Figura 5 – Mapa do Concelho de Peniche (P – área perturbada; R- área de referência)

## 2.2 CAMPANHAS DE AMOSTRAGEM

Este trabalho teve início no âmbito do projecto “monitorização do impacto da ETAR de Peniche nas comunidades macrobentónicas litorais”, coordenado pelo Professor Doutor Paulo Maranhão, da Escola Superior de Tecnologia do Mar (Instituto Politécnico de Leiria, Pólo de Peniche). As amostragens foram realizadas mensalmente, de Abril 2004 a Julho de 2005, excluindo Maio e Agosto de 2004.

Foram escolhidas duas áreas de estudo (Figs. 5, 6 e 7): Porto da Areia Sul (referência) e a zona onde se efectuam as descargas da ETAR (perturbada). Ambas apresentam substrato calcário, sendo também semelhantes na exposição (aproximadamente a Sul) e no hidrodinamismo, o que permite estudar e comparar o impacto daquela fonte de poluição nas populações de *L. neritoides*.

A ETAR de Peniche foi construída em 1998 e tem tratamento primário e secundário.



Figura 6 – Porto da Areia Sul (zona de referência).

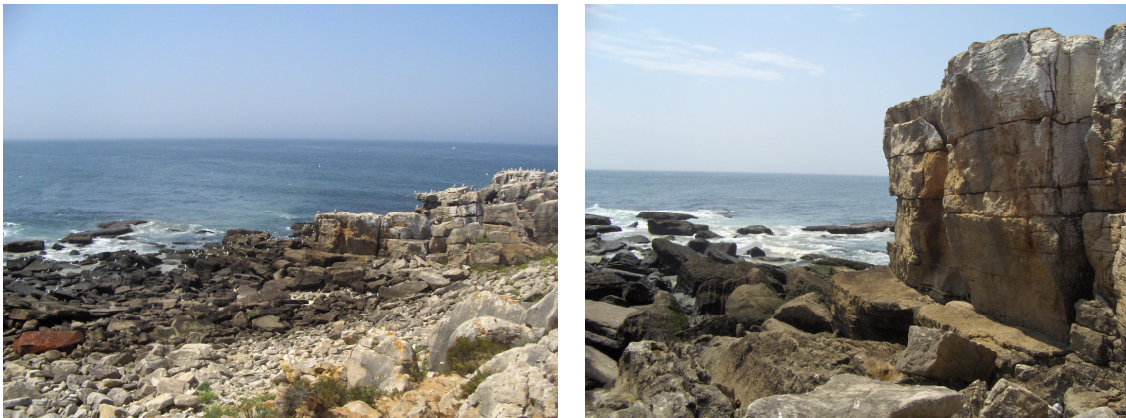


Figura 7 – Área vizinha à ETAR (zona perturbada).

Em cada área foram delimitados três níveis verticais: N1 – nível inferior; N2 – nível médio; N3 – nível superior. Na zona da ETAR a amostragem foi realizada num bloco com cerca de 6 metros (acima do nível do mar, em maré baixa): cada 2 metros correspondendo aproximadamente a um nível de amostragem (N1, N2 e N3). Na área de referência a amostragem em N1 e N2 foi feita em pequenas rochas encontradas à mesma altura tidal da área perturbada. Para o nível superior foi escolhida uma parede com cerca de 15 metros de altura (Fig. 8).

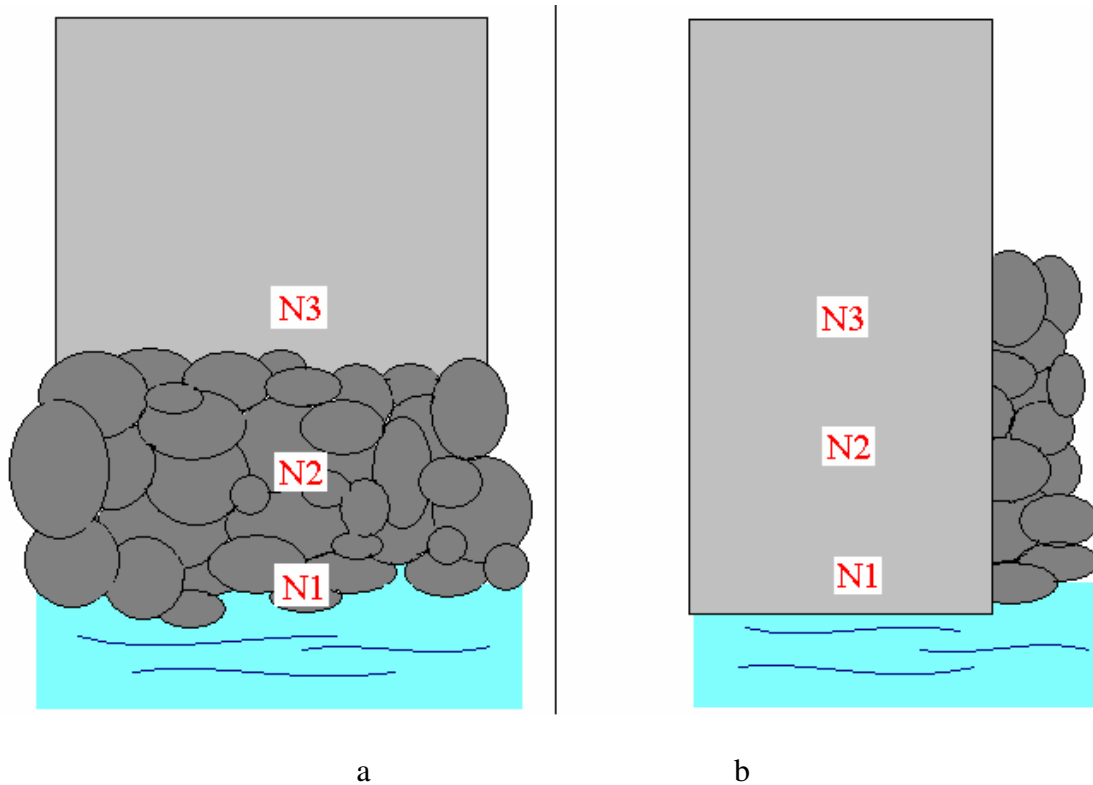


Figura 8 – Esquema dos locais de amostragem na área de referência (a) e na perturbada (b).

Em cada nível, três quadrados (15x15m) foram colocados aleatoriamente, tendo sido retirados todos os indivíduos que aí se encontravam. O número de indivíduos recolhidos por quadrado variou desde 4 até 925. Em cada data e local de amostragem foi medido o pH e armazenadas amostras de água para posteriores análises químicas (nutrientes) e quantificação de clorofila *a*. Foram também realizadas análises bacteriológicas (*Enterobacteriaceae*, coliformes, *E. coli* e *Pseudomonas*) na água recolhida na amostragem de Março de 2005.

### 2.3 PROCEDIMENTO LABORATORIAL

Todos os indivíduos (total de 26 096) foram contados e medidos (altura máxima da concha) utilizando uma lupa Leica WILD M8. A biomassa foi determinada a partir do peso seco livre de cinzas (AFDW), tendo sido os indivíduos pesados de forma a



determinar o seu peso húmido, e em seguida colocados na estufa por quatro dias, a 60°C. O próximo passo consistiu na sua pesagem, a fim de determinar o seu peso seco. Finalmente, foram colocados numa mufla a uma temperatura de 450°C durante oito horas, para se obter o peso seco livre de cinzas.

Filtraram-se as amostras de água (filtros de fibra de vidro, Whatman GF/F) que depois de congelaram a -18°C, até serem realizadas as análises químicas utilizando os métodos descritos em *Limnologisk Metodik* (1992), para calcular o conteúdo em amoníaco (NH<sub>3</sub>-N) e fosfato (PO<sub>4</sub>-P), em Strickland & Parsons (1972) para nitrato (NO<sub>3</sub>-N) e nitrito (NO<sub>2</sub>-N). Para quantificação da clorofila *a*, as amostras de água foram também filtradas e seguiu-se o protocolo de extração de Parsons *et al.* (1985). Realizaram-se, também, análises bacteriológicas (Enterobacteriaceae, coliformes, *E. coli* e *Pseudomonas*) na água recolhida na amostragem de Março de 2005.

## 2.4 ANÁLISE DOS DADOS

A estrutura da população e o crescimento foram estudados com base na análise de distribuições de frequências (por classes de tamanho). Calculou-se, igualmente, a densidade (ind.m<sup>-2</sup>) e biomassa (g.m<sup>-2</sup>) de *L. neritoides* por local de amostragem. A biomassa foi estimada de acordo com a equação de conversão: biomassa=0,00001x (altura da concha)<sup>3,3993</sup> (R<sup>2</sup>=0,9855; N=143).

A produção secundária anual foi calculada recorrendo ao método da frequência do tamanho de Benke (1979)

$$P = a \left[ \sum_{j=1}^{a-1} (\bar{N}_j - \bar{N}_{j+1}) \times \sqrt{(\bar{W}_j - \bar{W}_{j+1})} \right] \cdot \frac{365}{CPI}$$

onde  $\bar{N}_j$  é a densidade média na classe de tamanho *j* (ind.m<sup>-2</sup>);  $\bar{W}_j$  o peso médio individual na classe de tamanho *j* (mg AFDW); CPI o intervalo de produção da coorte,

i.e. a duração média de vida (dias); e  $j$  e  $j+1$  classes de tamanho consecutivas ( $j=1,2, \dots$ , a). Considera-se que a duração de vida de *L. neritoides* varia entre 5 e 7 anos (Lysaght, 1941). Nos cálculos foram ignoradas as classes de tamanho sem indivíduos, quando posicionadas no início ou fim da coluna correspondente.

Procedeu-se a uma Análise de Redundância (RDA) de forma a avaliar o efeito dos parâmetros ambientais na abundância e biomassa de *L. neritoides* nas diferentes datas e locais de amostragem. Para tal foi utilizado o programa CANOCO 4.5 (Ter Braak & Smilauer, 2002). Recorreu-se ao STATISTICA para determinar correlações entre todos os parâmetros ambientais medidos – nitratos, nitritos, amoníaco, fosfato e sílica, pH, clorofila *a* temperatura atmosférica (média mensal), temperatura da água do mar (média mensal) e pluviosidade.

Os dados respeitantes à temperatura atmosférica e à precipitação mensal foram obtidos na estação meteorológica do Cabo Carvoeiro, enquanto que os dados respeitantes à temperatura da água do mar se obtiveram no Porto de Peniche.

**CAPÍTULO 3** \_\_\_\_\_ **RESULTADOS**

### 3.1 VARIÁVEIS AMBIENTAIS

A temperatura atmosférica e da água do mar apresentam padrões muito semelhantes: máximo registado no Verão (Agosto 2004) e mínimo no Inverno (Fevereiro 2005). Quanto à pluviosidade, o máximo foi atingido em Outubro de 2004 (689 mm), sendo Junho e Julho de 2004 e Maio e Junho de 2005 meses secos. O pH variou mais na área perturbada, oscilando entre 7,63 e 8,79 (Tabela II).

Tabela II – Parâmetros ambientais ( $\text{NO}_3^-$  – nitrato;  $\text{NO}_2^-$  – nitrito;  $\text{NH}_4^+$  – amoníaco;  $\text{PO}_4^{3-}$  – fosfato; Si – sílica; Cl *a* – clorofila *a*) e microbiológicos (Enterobacteriaceae, coliformes, *E. coli* e *Pseudomonas*)

	Área de Referência			Área Perturbada		
	Min.	Max.	Média ± DP	Min.	Max.	Média ± DP
Temp. atm. (°C)	10,46	20,43	15,77 ± 3,06	10,46	20,43	15,77 ± 3,06
Temp. água mar (°C)	13,03	19,58	16,25 ± 1,85	13,03	19,58	16,25 ± 1,85
pH	7,73	8,52	8,18 ± 0,199	7,63	8,79	8,07 ± 0,31
$\text{NO}_3$ (mg.L <sup>-1</sup> )	0,009	28,55	2,04 ± 7,34	0,153	7,73	0,77 ± 1,94
$\text{NO}_2$ (mg.L <sup>-1</sup> )	0,002	3,518	0,292 ± 0,896	0,079	1,232	0,24 ± 0,29
$\text{NH}_4$ (mg.L <sup>-1</sup> )	0,0013	2,663	0,223 ± 0,692	0,041	41,33	5,87 ± 12,47
$\text{PO}_4$ (mg.L <sup>-1</sup> )	0,003	1,327	0,104 ± 0,339	0,041	4,451	0,99 ± 1,56
Si (mg.L <sup>-1</sup> )	0,063	0,941	0,179 ± 0,212	0,084	2,066	0,45 ± 0,63
Cl <i>a</i> (mg.m <sup>-3</sup> )	0,208	5,765	1,828 ± 1,511	0,081	2,355	0,91 ± 0,66
Enterobacteriaceae (cfu/mL)		0,06			31,6	
Coliformes (cfu/mL)		0,075			89	
<i>E. coli</i> (cfu/mL)		0,375			> 300	
<i>Pseudomonas</i> (cfu/mL)		0,8			135	

A concentração de nutrientes (amoníaco, fosfato, sílica, nitratos e nitritos) é, em geral, superior na zona poluída. Contudo, notaram-se alguns picos de concentração: em ambas as áreas, para todos os nutrientes, em Junho de 2004; na zona poluída em

Setembro de 2004 para amoníaco, fosfato e sílica, em Outubro de 2004 para fosfato, e em Fevereiro de 2005 para nitratos. A clorofila *a* quantificada foi sempre superior na área de referência, excepto em Março de 2005 (Tabela II).

Na amostra de Março de 2005 procedeu-se a uma análise bacteriológica: a água do mar na área perturbada continha quantidades muito superiores de Enterobacteriaceae, coliformes, *E. coli* e *Pseudomonas* (Tabela II).

### 3.2 PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA

De forma a estudar a abundância analisou-se a densidade e a biomassa da espécie nos dois locais de amostragem. Atendendo à densidade, *Littorina neritoides* apresenta valores superiores na zona perturbada (Fig. 9) ao longo dos 16 meses de estudo (média de 2651 ind/m<sup>2</sup> na área de referência e 6043 ind/m<sup>2</sup> no local perturbado).

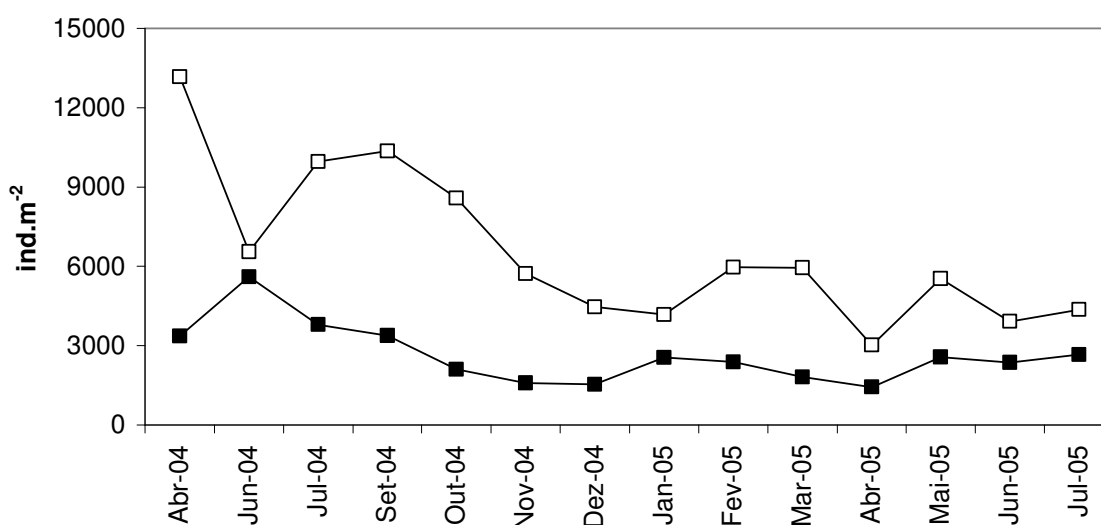


Figura 9 – Densidade (ind.m<sup>-2</sup>) nos dois locais de amostragem. ■ – referência; □ – perturbada

Analisando a densidade por nível observa-se que esta é muito semelhante, nos dois locais de amostragem, em N2 e N3, sendo as diferenças mais significativas no nível N1 (Fig. 10).

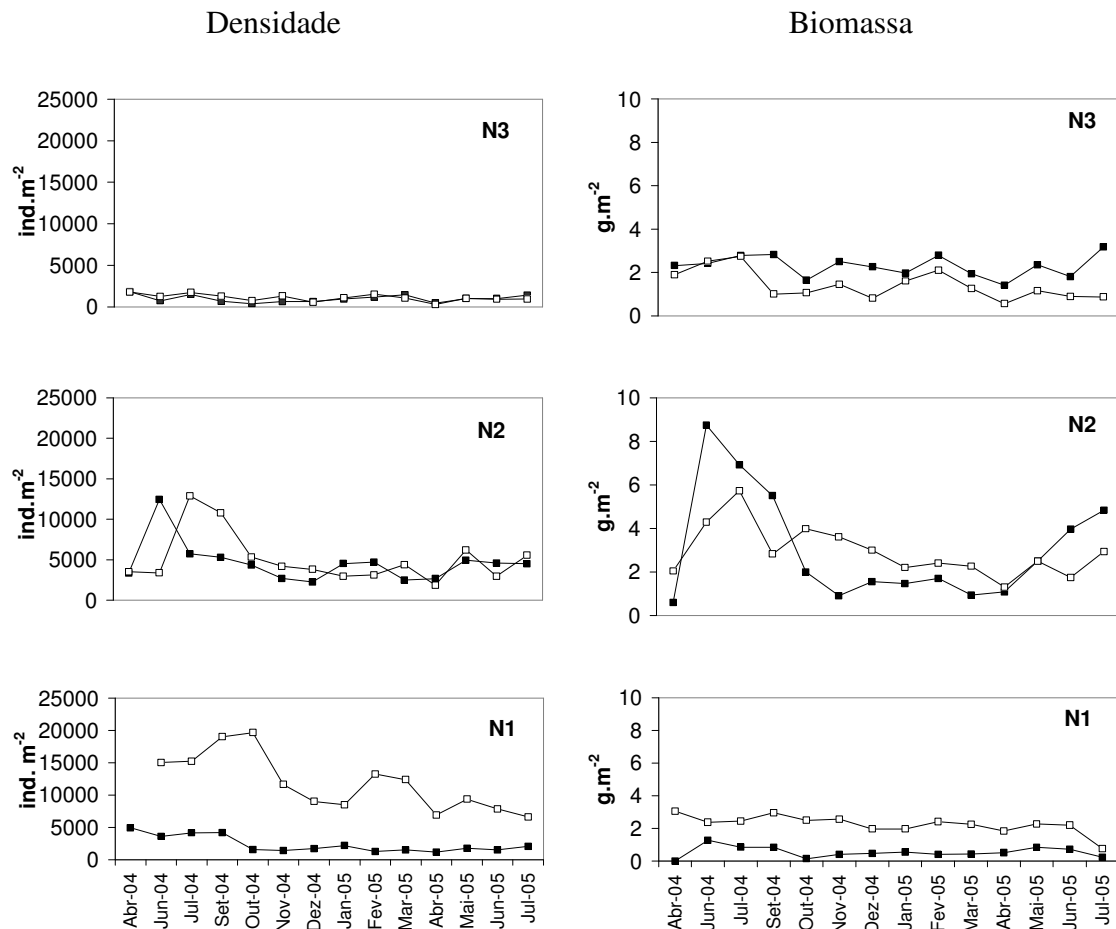


Figura 10 – Densidade ( $\text{ind.m}^{-2}$ ) e biomassa ( $\text{g.m}^{-2}$ ) por nível (N1, N2 e N3) ao longo dos meses de amostragem. ■ – referência; □ – perturbada.

Na estação de amostragem ETAR a densidade é mais elevada junto ao mar (N1), diminuindo à medida que se sobe na costa. No entanto, o mesmo não se observa na área de referência, onde as maiores densidades de verificam no nível intermédio (N2), seguido do nível inferior (N1) e só depois N3.

A biomassa é superior na área perturbada no Outono e no Inverno, mas na Primavera e no Verão é mais elevada na zona de referência (Fig. 11). No nível inferior (N1) os indivíduos apresentam maior biomassa na área perto da ETAR. O contrário sucede no nível superior (N3). No nível intermédio (N2) encontra-se um padrão semelhante ao observado no gráfico da biomassa total: ou seja, valores superiores para o

local perturbado no Outono/Inverno e para a área de referência na Primavera/Verão (Fig. 10).

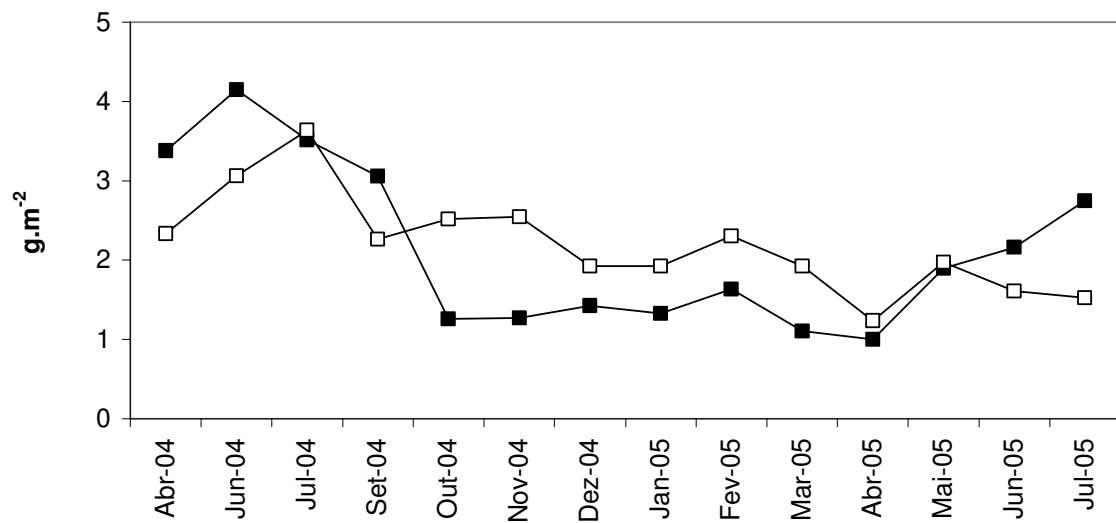


Figura 11 – Biomassa (g.m<sup>-2</sup>) nos dois locais de amostragem. ■ – referência; □ – perturbada

### 3.2.1 DISTRIBUIÇÃO DE ACORDO COM AS VARIÁVEIS AMBIENTAIS

Tendo como objectivo, tentar compreender se a abundância de *L. neritoides* nos dois locais de amostragem está relacionada com os parâmetros ambientais, efectuou-se uma análise de redundância (RDA). Da variância total, 48,8% é explicada pelas datas e locais de amostragem e 88,1% deve-se à interacção abundância de *L. neritoides* – parâmetros ambientais.

De entre todos os parâmetros ambientais considerados, apenas o fosfato é significativo estatisticamente ( $P < 0,05$ ). Recorreu-se ao programa STATISTIC para se tentar perceber se este facto se devia à existência de correlações entre os parâmetros ambientais. Efectivamente, todos os parâmetros estão correlacionados entre si ( $p < 0,05$ ), excepto a precipitação que não está correlacionada com nenhuma das restantes variáveis ambientais.

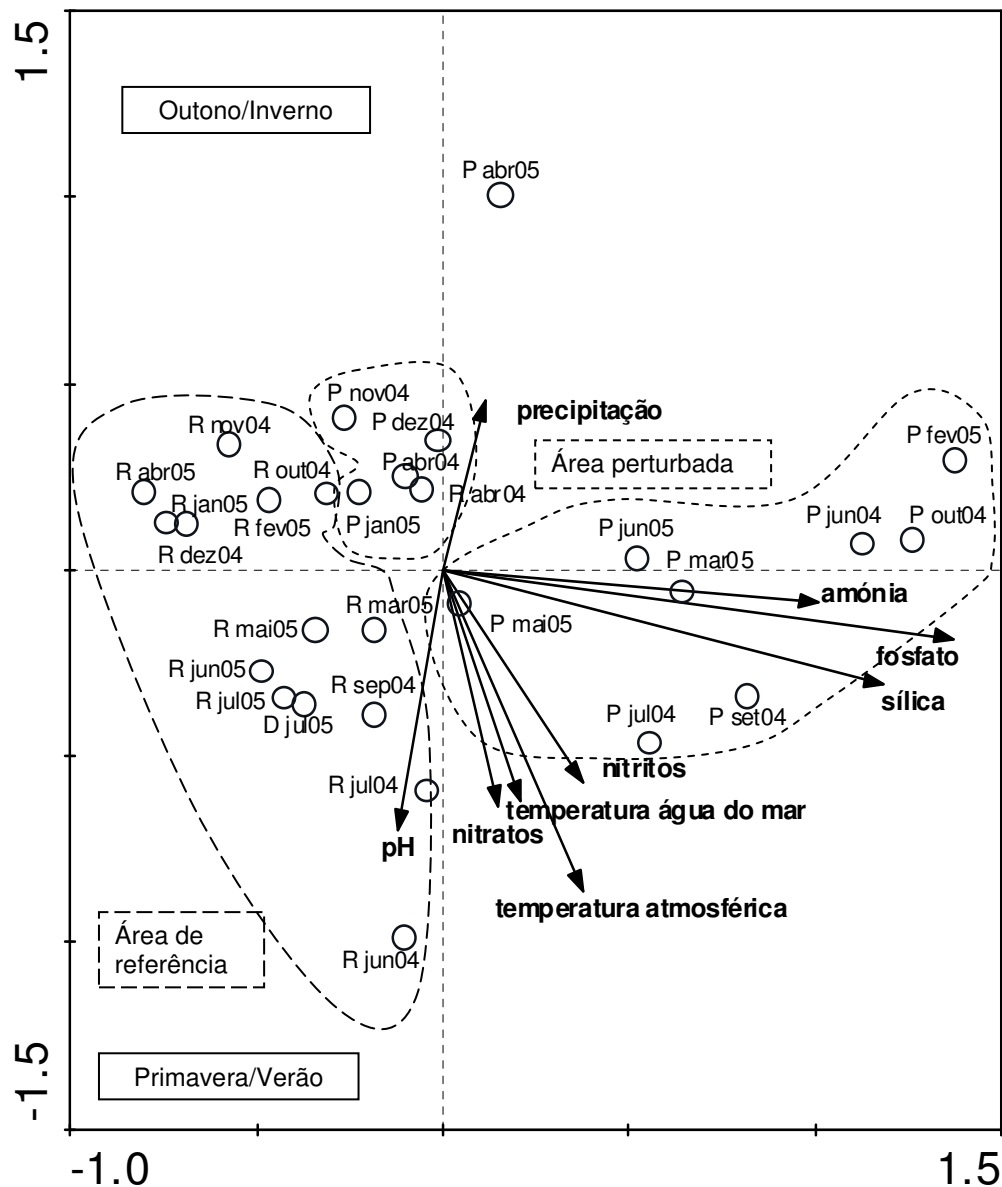


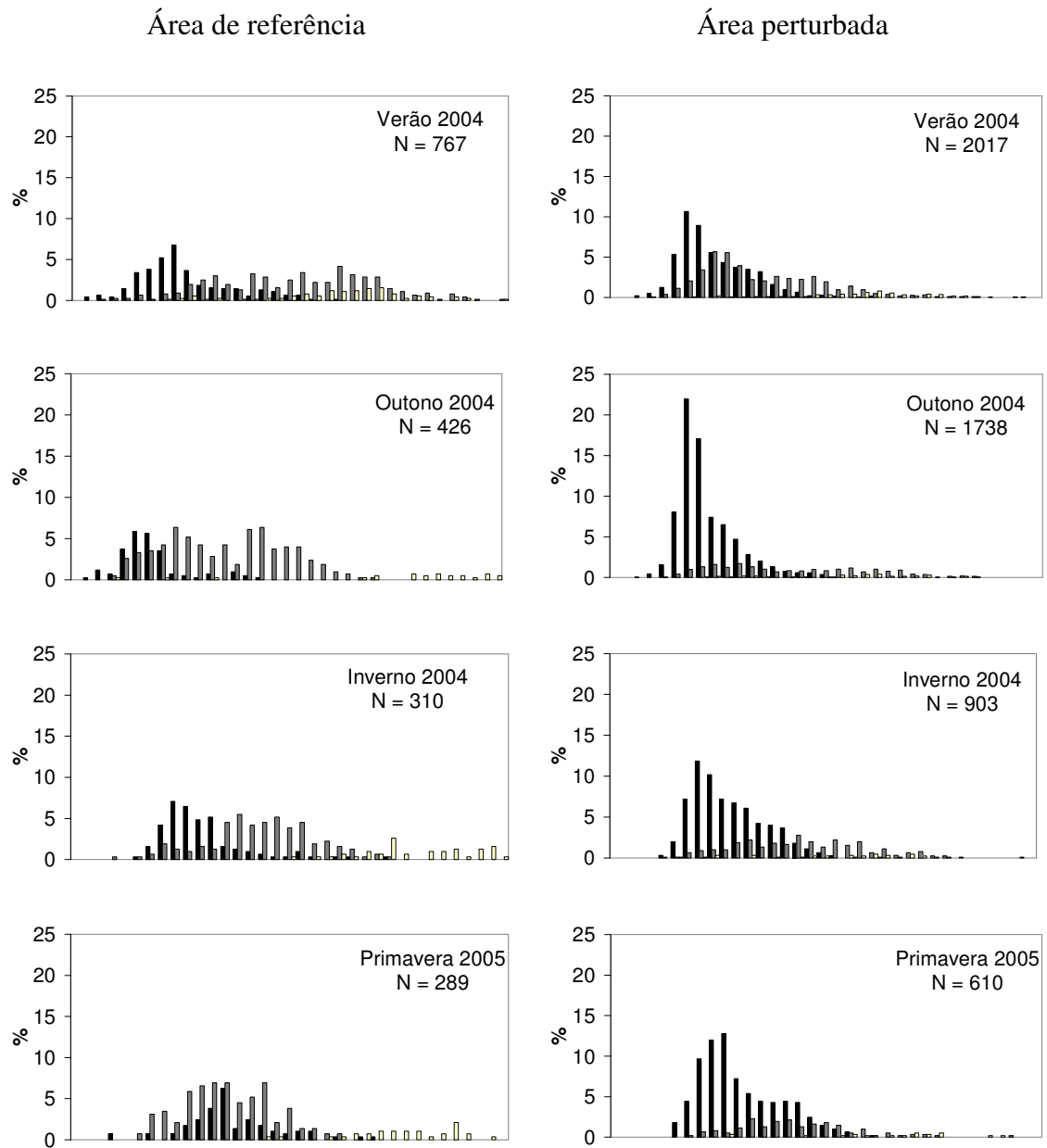
Figura 12 – Diagrama de ordenação para os dois primeiros eixos da análise de redundância (RDA) utilizando dados de abundância de *Littorina neritoides* (R- área de referência; P – área perturbada)

Na análise efectuada detectaram-se diferenças espaciais (Fig. 12): as amostragens do local de referência surgem no lado esquerdo do diagrama e no lado direito as colheitas da ETAR (local perturbado). Observa-se, também, um gradiente temporal: amostragens de Primavera e Verão estão colocadas nos quadrantes inferiores e as amostragens de Outono e Inverno estão situadas nos quadrantes superiores.



### 3.3 ESTRUTURA DA POPULAÇÃO E PRODUÇÃO

A distribuição dos indivíduos pelas diferentes classes de comprimento, ao longo dos meses de amostragem, permite estudar a estrutura populacional de *L. neritoides* em ambos os locais de estudo (Fig. 13).



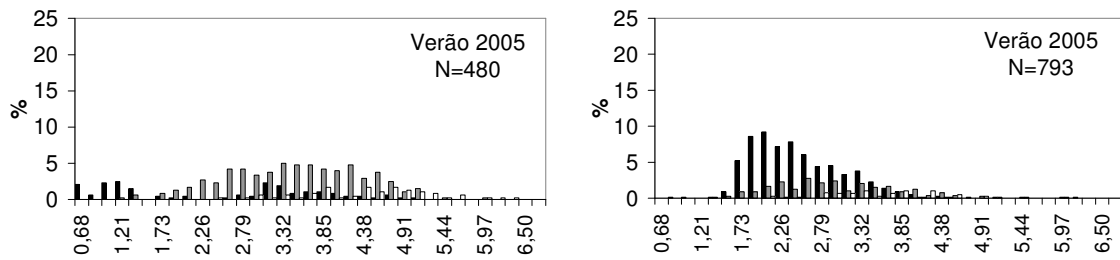


Figura 13 – Diferenças sazonais na estrutura populacional de *Littorina neritoides* por nível de amostragem ■ – N1; ■ – N2; □ – N3 nos dois locais de estudo

O indivíduo mais pequeno media 0,59mm, enquanto que o maior apresentava 8,41mm no local de referência e 6,59mm na área perturbada. No estudo realizado por Fretter & Manly (1977) o indivíduo mais pequeno que recrutou a área media 0,37mm. A ausência de classes de tamanho inferiores a 0,59mm, bem como o facto de, em apenas 5 datas de amostragem, se encontrarem indivíduos com dimensões inferiores a 0,8mm sugere que a nossa amostragem não foi bem sucedida na captura dos indivíduos mais pequenos destas populações. Por esta razão, a comparação dos juvenis será feita com base nos indivíduos que se encontram no nível inferior (N1), que apresentam as menores dimensões em todas as nossas amostragens.

Em ambos os locais, o tamanho dos indivíduos aumenta quando se avança do nível mais perto do mar (N1) para o superior (N3). Na área exposta à fonte de poluição o tamanho dos indivíduos, em cada um dos níveis, é relativamente constante ao longo do ano. Apenas no nível N1 surgem indivíduos de menores dimensões no Verão de 2005. No entanto, no local de referência a distribuição dos indivíduos pelas classes de tamanho é muito mais dinâmica entre estações do ano. No Verão (de 2004 e 2005) o nível N1 tem os indivíduos mais pequenos, sendo que N2 e N3 partilham muitas classes de comprimento. De Outono de 2004 até à Primavera de 2005 é possível observar que N1 e N2 partilham, de forma cada vez mais evidente, mais classes de tamanho, e que N3 tem os indivíduos de maiores dimensões.

Comparando a estrutura da população entre os locais de amostragem (Fig. 14) observa-se que os indivíduos de menores dimensões se encontram na área perturbada e os maiores no local de referência.

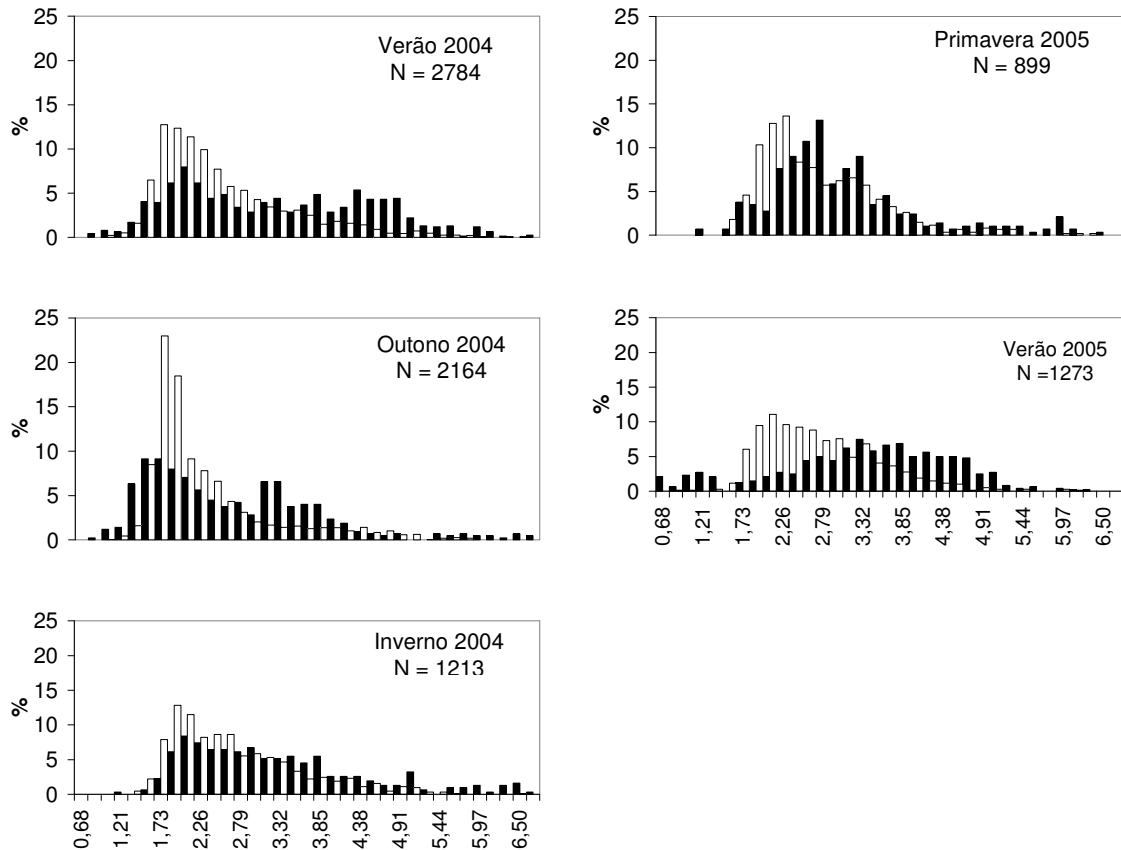


Figura 14 – Diferenças sazonais na estrutura populacional de *Littorina neritoides* por local de amostragem ■ – referência; □ – perturbado

A forma dos histogramas é também diferente. O histograma correspondente à área perturbada tem um máximo nas classes de tamanho menores, seguido de um acentuado decréscimo. O histograma do local de referência apresenta vários máximos locais. No primeiro local (ETAR) o gráfico mostra uma curva típica para recrutamento contínuo, o que não acontece no local de referência. Contudo, neste último também não é possível distinguir coortes. Verifica-se, ainda, um pulso na reprodução entre Junho e Setembro, mais evidente em 2005 do que em 2004, e também mais no local de referência.

A libertação de cápsulas – embora não tenham sido contabilizadas – parece ocorrer em quase todas as datas de amostragem (observação pessoal), o que é consistente com a reprodução contínua da espécie.

A produção secundária é superior no local perturbado ( $1,7\text{g.m}^{-2}$  na área de referência e  $2,2\text{g.m}^{-2}$  no local perturbado) enquanto que a razão P/B (0,9 no local de referência e 1,1 na área vizinha à ETAR) é semelhante.

**CAPÍTULO 4** \_\_\_\_\_ **DISCUSSÃO**

#### 4.1 VARIÁVEIS AMBIENTAIS

Os organismos vivos e o meio (factores abióticos) estão ligados de forma indiscutível, interagindo entre si (Odum, 1988). Contudo, caracterizar o ambiente de uma população nem sempre é fácil. Tal é especialmente visível na zona intertidal, que apresenta um dos ambientes mais dinâmicos da biosfera devido à subida e descida da maré (Molles, 1999).

A presença da ETAR parece influenciar a concentração de nutrientes e a quantidade de bactérias presentes na água do mar. Os picos de nutrientes observados devem estar relacionados com descargas daquela fonte de perturbação. Na tabela III estão registados os valores padrão para o País Basco (Espanha) relativos às concentrações de amónia, nitrato e fosfato, indicadores utilizados na Directiva Quadro da Água (Bald *et al.*, 2005). Com base nesses dados, verifica-se, pois, que apenas os picos de concentração de nutrientes registados durante a realização deste estudo têm um estatuto físico-químico “mau”.

Tabela III – Condições físico-químicas de referência

	Amónia (mg.l <sup>-1</sup> )	Nitrato (mg.l <sup>-1</sup> )	Fosfato (mg.l <sup>-1</sup> )
Estatuto físico-químico “bom”	0.036	0.310	0.042
Estatuto físico-químico “mau”	0.28	0.800	0.100

No estudo das comunidades marinhas, um dos parâmetros ambientais essenciais é a concentração de clorofila *a*. Sendo o principal pigmento fotossintético nas plantas, esta é utilizada como forma de medição indirecta da abundância de fitoplâncton, permitindo quantificar a produção primária – base de toda a cadeia trófica – de um determinado

local (Molles, 1999). No nosso estudo, e ao contrário do que seria de esperar, a clorofila *a* é superior no local de referência (excepto em Março de 2005).

O fitoplâncton necessita, para sintetizar matéria orgânica, de nutrientes e luz, pelo que a maior abundância de fitoplâncton deveria ocorrer na área com concentrações de nutrientes mais elevadas. A intensidade luminosa vai variar com a profundidade, condições meteorológicas e transparência da água (Sumich & Morrissey, 2004). Na área perturbada a turbidez da água é superior (devido ao efluente da ETAR, bem como à presença de bactérias), o que pode explicar a menor abundância de fitoplâncton.

#### **4.2 PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO E ABUNDÂNCIA**

Uma população é um conjunto de organismos da mesma espécie que ocupa um determinado espaço. Não é estática, evoluindo ao longo do tempo. Estas mudanças – a que se dá o nome de dinâmica populacional – reflectem-se na abundância dos indivíduos, na sua distribuição espacial, crescimento, natalidade e mortalidade (Odum, 1988; Pité & Avelar, 1996).

A densidade é uma forma de expressar a abundância. No presente trabalho, a densidade é superior na área perturbada, sendo que a principal diferença ocorre no nível N1. Atendendo ao facto de que é neste nível que ocorre o recrutamento bentónico de juvenis, a referida diferença de densidades deve estar relacionada com este processo.

As larvas de *L. neritoides*, antes de colonizarem a costa rochosa, encontram-se no plâncton. Dois aspectos da biologia larvar são particularmente importantes, uma vez que vão afectar a futura estrutura da população. Em primeiro lugar, a própria sobrevivência das larvas no plâncton (encontrarem alimento, manterem-se numa posição adequada na coluna de água, evitarem predadores); em segundo, conseguirem colonizar um substrato

rochoso, terminando a sua metamorfose e atingindo o estado adulto (Little & Kitching, 1996).

De acordo com Newell (1979) e Nybakken (2000), as larvas não parecem colonizar um qualquer substrato rochoso ao acaso, mas sim investir tempo a seleccioná-lo. Por outro lado, características físico-químicas do substrato (presença de fendas, por exemplo), luz, pressão e salinidade na coluna de água, ou presença de determinadas espécies são tidos como alguns dos factores que podem influenciar a escolha de uma área de colonização (Newell, 1979; Nybakken, 2001). Neste enquadramento, parece que uma maior concentração de nutrientes na área perturbada aumenta o crescimento das algas na superfície rochosa, que são o alimento de *L. neritoides*, podendo tal factor ser atractivo para as larvas, e justificativo das densidades elevadas em N1.

Apesar da ocorrência de grandes diferenças na densidade em N1 (média de 2 347 ind.m<sup>-2</sup> no local de referência e 11 878 ind.m<sup>-2</sup> na área perturbada), nos níveis N2 e N3 verifica-se que os valores se aproximam em ambas as zonas (N2: 4 615 ind.m<sup>-2</sup> e 5 073 ind.m<sup>-2</sup>, N3: 992 ind.m<sup>-2</sup> e 1 112 ind.m<sup>-2</sup> na área de referência e na zona vizinha à ETAR, respectivamente). Ora, estes números parecem reflectir uma forte mortalidade no nível N1 na área perturbada, o que pode estar relacionado com a competição entre juvenis ou com as características da água do mar, dada a quantidade de bactérias. Chen & Richardson (1987) defendem que um elevado recrutamento irá aumentar a competição intraespecífica por alimento e espaço, no nível mais próximo do mar – que é, também, uma área extremamente instável devido à acção das ondas – o que explica que os gastrópodes comecem a deslocar-se para níveis superiores, em busca de abrigo, assim que o seu tamanho lhes permite (Lysaght, 1941; Fretter & Manly, 1977). Porém, o nível N2 tem um número de fendas limitado, pelo que a falta de abrigo pode também causar mortalidade nos juvenis que tentam mover-se para níveis superiores. Todavia,



todas estas possíveis causas (competição, falta de abrigo) não parecem suficientes para explicar o nível de mortalidade observado. Assim, tem sentido admitir que o ambiente de stress químico produzido pela presença da ETAR seja responsável por uma importante parte da elevada mortalidade, diminuindo, deste modo, o número de juvenis que atinge a fase adulta.

Em ambos os locais, a biomassa é superior durante o período de Primavera/Verão, diminuindo durante o Outono e Inverno. Comparando os dois locais, por nível, observa-se que em N1 os valores de biomassa são mais elevados na área perturbada, o que pode ser explicado pelo grande número de juvenis. Pelo contrário, no nível N3 é a área de referência que apresenta maior biomassa, o que – tendo em atenção que as densidades neste nível são semelhantes em ambos os locais – parece demonstrar que os indivíduos são maiores (têm maior crescimento ou tempo de vida mais longo) na zona afastada da fonte de perturbação. Por fim, no nível N2 observa-se um incremento na biomassa durante a Primavera e o Verão, especialmente no local de referência. Este aumento é menos acentuado na área perturbada, o que pode ser devido a taxas de crescimento menores, também resultado do ambiente de stress químico provocado pela presença da ETAR.

Sendo estes gastrópodes fortemente influenciados pelas condições ambientais, interessa avaliar qual o efeito da ETAR na abundância de *L. neritoides*. Para tal, recorreu-se a uma análise multivariada, útil para tratar conjuntos de dados com uma dimensão elevada de variáveis. Dentro desta análise pode-se escolher um modelo linear (mudanças absolutas) ou unimodal (diferenças relativas), e ainda optar por um método directo (análise das respostas das comunidades às variáveis ambientais) ou indirecto (análise de toda a variação na comunidade). Foi escolhido para os nossos dados uma análise de redundância (RDA), modelo linear e método directo. Os resultados

confirmam a presença de concentrações mais elevadas de nutrientes na zona perturbada (especialmente amoníaco, fosfato e sílica). Estas podem ser explicadas pela presença da ETAR já que, na falta de tratamento terciário, não existe controlo dos nutrientes presentes nas descargas lançadas para o mar. As restantes variáveis ambientais parecem correlacionadas com os meses de amostragem de acordo com a estação do ano: precipitação correlacionada com os meses de Outono/Inverno, e temperatura atmosférica e da água do mar com os meses de Primavera/Verão.

#### 4.3 ESTRUTURA DA POPULAÇÃO E PRODUÇÃO

Relativamente à estrutura da população, observou-se que, nos dois locais de estudo, o tamanho dos indivíduos aumenta à medida que se distanciam do nível do mar. O que se explica pelo facto de a colonização ter lugar no nível inferior, deslocando-se, posteriormente, os indivíduos maiores para níveis superiores (Fretter & Manly, 1977). No que diz respeito às densidades, observam-se algumas diferenças. No local de referência, os valores mais elevados foram registados em N2. O nível N1, sendo o mais instável, é apenas ocupado pelos indivíduos de *L. neritoides* até atingirem o tamanho necessário para se dirigirem para níveis superiores. Os indivíduos mais velhos são encontrados em N3, com baixas densidades mas maiores dimensões. Na área perturbada as densidades mais elevadas são em N1, devido ao recrutamento significativo observado naquela zona. Desses juvenis, apenas alguns atingem o nível N2. Em ambos os locais, os indivíduos mais velhos ocupam o nível N3 (Fig. 14). Pode-se, então, concluir que na área perturbada há um maior recrutamento (número superior de juvenis) mas os indivíduos dos níveis superiores (adultos) são mais pequenos, talvez por apresentarem menor crescimento ou por terem uma duração de vida mais curta.

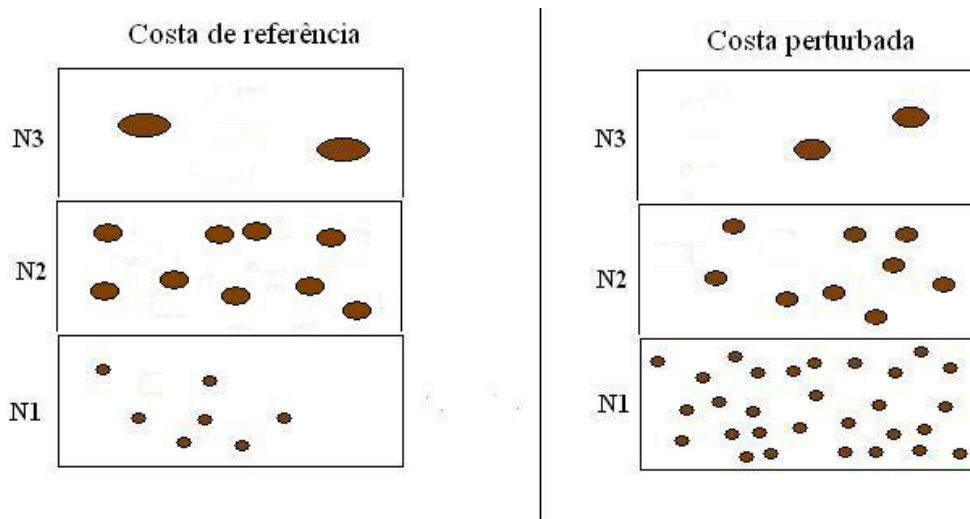


Fig. 14 – Esquema do gradiente de tamanho de *Littorina neritoides* ao longo da costa

Não foi possível calcular taxas de crescimento no nosso estudo devido à ausência de coortes. Na tabela IV encontram-se alguns valores de taxas de crescimento de outros estudos realizados na Europa, e pode-se verificar que são muito variáveis, parecendo ser mais influenciadas pelas características locais da costa rochosa do que pela latitude (McGrath, 1997).

Foi também calculada a produção secundária, parâmetro importante para compreender a dinâmica populacional, uma vez que combina duas variáveis (crescimento individual e sobrevivência) de grande valor ecológico. Aquela pode ser definida como a quantidade de matéria orgânica viva, ou biomassa, que é produzida por uma população durante um determinado período de tempo (Resh & Rosenberg, 1984; Mothiversen & Dall, 1989). No presente estudo, a produção secundária é superior na área perturbada, o que pode ser explicado pelo elevado recrutamento. Este elevado número de juvenis, embora pareça ser indicativo de um maior efectivo populacional, acaba por se transformar, devido à elevada mortalidade, numa população adulta menos estável. Assim, a produção secundária observada não parece corresponder a um crescimento efectivo da população.

Tabela IV – taxa de crescimento, época de recrutamento e libertação de cápsulas, produção secundária e razão P/B de *Littorina neritoides* em diferentes populações europeias

Local de estudo	Taxa de crescimento	Recrutamento	Produção e libertação cápsulas	P g.m <sup>2</sup> .ano <sup>-1</sup>	P/B	Referências
Irlanda	—	—	Set – Fev	—	—	Cronin <i>et al</i> , 2000
Irlanda	2mm em 5 meses	Junho	—	—	—	McGrath, 1997
Irlanda	—	—	Out – Jun	—	—	Dorman, 1986
País de Gales	2mm em 9 meses	—	—	—	—	Hughes & Roberts, 1980
País de Gales	—	—	Mar – Jun (1977)	—	—	Hughes & Roberts, 1980
			Jan – Jun (1978)			
Inglaterra	Diminui com a idade	—	Set – Abr	—	—	Lysaght, 1941
Inglaterra	—	Todo o ano Max: Mar/Abr, Set/Out	Set – Abr	—	—	Fretter & Graham, 1980
Inglaterra	—	Todo o ano Max: Mar/Abr, Set/Out	—	—	—	Fretter & Mainly, 1977
França	3mm em 7 meses	—	—	—	—	Daguzan, 1976
Estudo actual	—	Todo o ano Max: Jun/Set	—	Ref: 1.8 Pert: 2.3	Ref: 1.0 Pert: 1.1	
Israel	—	—	Dez – Abr	—	—	Palant & Fishelson, 1968

Em relação à reprodução desta espécie, o nosso trabalho sugere que o recrutamento ocorre durante todo o ano, tendo sido observada uma curva típica para reprodução contínua, especialmente na área perturbada. Tal indica que, na zona de Peniche, *L. neritoides* apresenta reprodução contínua, com um pulso em Junho/Setembro. Este resultado é consistente com outros estudos desenvolvidos, onde se observaram dois pulsos: Março/Junho e Setembro/Outubro (Tabela IV). No entanto, o pulso registado neste trabalho não é tão marcado como em outros estudos – o que, estando numa latitude mais a sul (com temperaturas moderadas) parece sugerir que o aumento da temperatura não é condição essencial para que os indivíduos das populações de Peniche colonizem a costa rochosa.

Ainda neste domínio, Hughes & Roberts (1980) estudaram a produção e libertação de cápsulas, tendo verificado que existe uma diminuição, em ambos os extremos latitudinais, no número de meses em que ocorrem. Por outro lado, estes dois processos não são contínuos no tempo, tendo Lysaght (1941) observado um ritmo quinzenal marcado a cada lua nova ou cheia na libertação das cápsulas para o mar. Para finalizar, salienta-se que as cápsulas encontradas em considerável número nas amostragens não foram tidas em conta na análise.

#### **4.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A zona intertidal, embora ocupe uma área reduzida, é uma das mais bem conhecidas de todo o domínio marinho, dada a sua fácil acessibilidade e interesse ecológico. Contudo, a espécie *L. neritoides*, gastrópode intertidal muito comum, não tem sido objecto de muitos estudos. Este trabalho permitiu tomar conhecimento da dinâmica populacional desta espécie nas costas portuguesas, enquanto se analisou o efeito de uma ETAR nessa população.

Tal como em estudos anteriores, também nas costas de Peniche se observa um gradiente de tamanho (indivíduos maiores à medida que se sobe na costa), provocado por uma migração dos indivíduos maiores para níveis superiores. A reprodução é contínua, com um pulso em Junho/Setembro.

A descarga da ETAR parece ter efeito na estrutura da população de *L. neritoides*. Os nutrientes provenientes desse efluente aumentam a quantidade de algas presentes no substrato rochoso, o que pode fazer com que as larvas planctónicas escolham esta área para colonizar. O resultado é um muito maior número de juvenis nos níveis inferiores da área perturbada. No entanto, uma elevada mortalidade tem lugar, aproximando a densidade nos níveis superiores de ambas as áreas. Também o crescimento e/ou esperança média de vida parecem ser afectados, sendo os indivíduos junto à ETAR mais pequenos.

A área de referência parece ter uma população mais estável (menor mortalidade, maior crescimento e/ou tempo de vida). Tal facto sugere que as descargas da ETAR sem o tratamento adequado afectam a população de *Littorina neritoides*.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- Bald, J., Borja, A., Muxika, I., Franco, J. & V. Valência (2005). Assessing reference conditions and physico-chemical status according to the European Water Framework Directive: A case-study from the Basque Country (Northern Spain). *Marine Pollution Bulletin* 50: 1508–1522.
- Bosh, M. & I. Moreno (1984). Crescimento de *Littorina neritoides* (L.1758) (Molusco, Gasterópodo) en relación con la exposición en Balears Acta IV Simposio Iberico Dos benthos marinho. Lisboa. 2: 197-207.
- Bosh, M. & I. Moreno (1985). Population structure of *Littorina neritoides* (L. 1758) (Mollusca Gastropoda) in the Balearic Coast. *Marine Ecology*.
- Bosh, M. & I. Moreno (1986). Spatial distribution of *Littorina neritoides* (L. 1758) (Mollusca, Gastropoda) in the supralitoral zone in the Balearic Islands. *Cahiers de Biologie Marine*, 42: 53-62.
- Chen, Y.S. & A.M.M. Richardson (1987). Factors affecting the size structure of two populations of the intertidal periwinkle *Nodilittorina unifasciata* (Gray, 1839) in the Derwent River, Tasmania. *Journal of Molluscan Studies* 53: 69–78.
- Colomba M.S., R. Vitturi, L. Castriota, R. Bertoni & A. Libertini (2002). FISH mapping of 18S-28S and 5S ribosomal DNA, (GATA)<sub>n</sub> and (TTAGGG)<sub>n</sub> telomeric repeats in the periwinkle *Melarhappe neritoides* (Prosobranchia, Gastropoda, Caenogastropoda). *Heredity* 88: 381–384.
- Cronin, M.A., Myers, A.A. & R.M. O’Riordan (2000). The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhappe neritoides* on the west and south coasts of Ireland. *Biology and the Environment*, 100B (2): 97-106.
- Cronin, M. A., Myers, A.A. & R. O’ Riordan (2003). The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhappe neritoides* on Clare Island. *New Survey of Clare Island Vol. 3: Intertidal Marine Ecology* Ed. A. Myers. 133-143.



- Daguzan, J. (1976a). Contribution a l'étude de la croissance et de la longévité de quelques littorinidae. Archives de Zoologie Experimentale et Générale 117 : 57-80.
- Daguzan, J. (1976b). Contribution à l'écologie dès Littorinidae (Mollusques gastéropods prosobranches). II *Littorina neritoides* (L.) et *Littorina saxatilis* (Olivi). Cahiers de Biologie Marine, 17: 213-236.
- Davey, J.T. (1983). The digenean parasites of *Littorina neritoides* (L.) in relation to microhabitat on the Plymouth breakwater. Canadian Journal of Zoology/Review of Canadian Zoology 61(5): 1058-1061.
- Dorman, J. (1986). Aspects of the biology of *Melarhaphe neritoides*. Unpublished MSc thesis, University College, Galway.
- Evans, R.G. (1948). The Lethal Temperatures of Some Common British Littoral Molluscs. The Journal of Animal Ecology 17 (2): 165-173.
- Fraenkel, G. (1961). Resistance to high temperatures in the Mediterranean snail, *Littorina neritoides*. Ecology, 42 (3): 604-606.
- Fretter, V. & R. Manly (1977). Settlement and early benthic life of *Littorina neritoides* (L) at Wembury, S Devon. Journal of Molluscan Studies 43: 255-262.
- Holland, D.L., R. Tantanasiriwong & P. J. Hannant (1975). Biochemical composition and energy reserves in the larvae and adults of the four british periwinkles *Littorina littorea*, *L. littoralis*, *L. saxatilis* and *L. neritoides*. Marine Biology 33 (3): 235-239.
- Hughes, R.N. & D.J. Roberts (1980a). Reproductive effort of winkles (*Littorina* spp.) with contrasted method of reproduction. Oecologia 47: 130–136.

- Hughes, R. N. & D.J. Roberts (1980b). Growth and reproductive rates of *Littorina neritoides* (L.) in north Wales. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 60: 591-9.
- Hughes, R.N. & D.J. Roberts (1981). Comparative demography of *Littorina rudis*, *L. nigrolineata* and *L. neritoides* on three contrasted shores in North Wales. *The Journal of Animal Ecology*, Vol. 50 (1): 251-268.
- Grech, M & P.J. Schembri (1989). A laboratory study of the behavioural responses of *Littorina neritoides* (Mollusca: Gastropoda) in relation to its zonation on Maltese shores (central Mediterranean). *Marine Behaviour Physiology* Vol. 15 (2):123-135.
- Knight, A.J., & R.D. Ward (1986). Purine nucleoside phosphorylase polymorphism in the genus *Littorina* (Prosobranchia: Mollusca). *Biochemical Genetics* 24 (5-6):405-413.
- Kronberg, I. (1990). Heat production in *Littorina saxatilis* Olivi and *Littorina neritoides* L. (Gastropoda: Prosobranchia) during an experimental exposure to air. *Helgoländer Meeresuntersuchungen* 44 (2): 125-134.
- Lavie, B. & E. Nevo (1987). Differential fitness of allelic isozymes in the marine gastropods *Littorina punctata* and *Littorina neritoides*, exposed to the environmental stress of the combined effects of cadmium and mercury pollution. *Environmental Management* 11(3): 345-349.
- Lebour, M.V. (1935). The breeding of *Littorina neritoides*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 20 (2): 373-378.
- Lebour, M.V. (1947). Notes on the inshore plankton of Plymouth. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 26 (4): 527-547.

- Limnologisk Metodik (1992). Ferskvandsbiologisk Laboratorium. Kobenhavns Universitet (ed.), Akademisk Forlag, København, 172pp.
- Little C. & J.A. Kitching (1996). The biology of rocky shores. Oxford University Press, 240 pp.
- Lysaght, A. (1941). The biology and trematode parasites of the gastropod *Littorina neritoides* (L.) on the Plymouth Breakwater. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 25: 41-67.
- McGrath, D. (1997). Population structure and recruitment of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* (L.) on an exposed rocky shore on the south coast of Ireland. Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy, Vol. 97B (1): 75-79.
- McKinney, M.L. & R.M. Schoch (1998). Environmental Science – Systems and solutions. Jones and Bartlett Publishers, 639 pp.
- Medeiros, R., L. Serpa, C. Brito, H. De Wolf, K. Jordaens, B. Winnepeninckx & T. Backeljau (1998). Radular myoglobin and protein variation within and among some littorinid species (Mollusca: Gastropoda). Hydrobiologia 378 (1-3): 43-51.
- Molles, M.C. (1999). Ecology: concepts and applications (1<sup>st</sup> Ed.). McGraw-Hill, 509pp.
- Mothiversen, T. & P. Dall (1989). The effect of growth pattern, sampling interval and number of size classes on benthic invertebrate production estimated by the size-frequency method. Freshwater Biology 22 (2): 323-331.
- Myers, A. A. & D. McGrath (1993). Settlement and Growth of the intertidal gastropod *M. neritoides* on the south coast of Ireland. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 73: 313-19.

- Nevo, E (1993). Complex pollution effects of two heavy metals (mercury and cadmium) the genetic structure of populations. MAP technical reports series. Athens [MAP TECH. REP. SER.].
- Nevo E. & B. Lavie B. (1989). Selection of allozyme genotypes of two species of marine gastropods (genus *Littorina*) in experiments of environmental stress by nonionic detergent and crude oil-surfactant mixtures. *Génétique sélection evolution* 21 (3): 295-302.
- Nevo E., Lavie, B. & R. Noy (1987). Mercury selection of allozymes in marine gastropods: Prediction and verification in nature revisited. *Environmental Monitoring and Assessment* 9 (3): 233-238.
- Newell, R.C. (1979). *Biology of intertidal animals* (3<sup>rd</sup> Ed.). Marine ecological surveys, Ltd, 781 pp.
- Noy, R, B. Lavie, E. Nevo (1987). The niche-width variation hypothesis revisited: Genetic diversity in the marine gastropods *Littorina punctata* (Gmelin) and *L. neritoides* (L.). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 109 (2):109-116.
- Nybakken, J.M. (2001). *Marine biology: an ecological approach* (5<sup>th</sup> Ed.). Benjamin Cummings, 516 pp.
- Nuwayhid M. A., D.L. Evans & L.G.L. Young (1985). Defensive behavior in littoral snails from Lebanon. *Malacological review* 18 (1-2): 9-14.
- Odum, E.P. (1988). *Fundamentos de Ecologia* (4a Ed.). Fundação Calouste Gulbenkian, 927 pp.
- Palant, B. & L. Fishelson (1968). *Littorina punctata* and *M. neritoides* from Israel: ecology and annual cycle of the genital system. *Israel Journal of Zoology* 17: 145-60.

- Patanè, L. (1933). Sul comportamento di *Littorina neritoides* L. Mantenuta in ambiente bobaero ed in altre condizioni sperimentali. Rendiconti della Accademia dei Lincei (6) 17: 962-67.
- Parsons, T. R., Maita, Y. & C. M. Lally (1985). Pigments. In: A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis. Pergamon Press, pp 101-104.
- Pinet, P.R. (2000). Invitation to oceanography (2<sup>nd</sup> Ed.). Jones and Bartlett Publishers, 555 pp.
- Pité, M.T. & T. Avelar (1996). Ecologia das populações e das comunidades. Fundação Calouste Gulbenkian, 315 pp.
- Raffaelli, D.G. & R. N. Hughes (1978). The effect of crevice size and availability on populations of *Littorina rudis* and *Littorina neritoides*. Journal of Animal Ecology 47: 71-83.
- Resh, V. H. & D. M. Rosenberg (1984). The Ecology of Aquatic Insects. Praeger, New York, 625pp.
- Saldanha, L. (1997). Fauna submarina atlântica (3<sup>a</sup> Ed.). Publicações Europa-América Lda. 361 pp.
- Stafford R. & M.S. Davies (2004). Temperature and desiccation do not affect aggregation behaviour in high shore littorinids in north-east England. Journal of Negative Results: Ecology and Evolutionary Biology. 1: 16-20.
- Stafford R. & M.S. Davies (2005). Examining refuge location mechanisms in intertidal snails using artificial life simulation techniques. Lecture Notes in Artificial Intelligence. Proceedings of the VIIIth European Conference on Artificial Life. 3630: 520-529.
- Stafford R. & M.S. Davies (2005). Spatial patchiness of epilithic biofilm caused by refuge-inhabiting high shore gastropods. Hydrobiologia. 545: 279-287.

- Strickland, J.D.H & T.R. Parsons (1972). A practical handbook of seawater analysis (2<sup>nd</sup> Ed.). Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada 167, 1-311.
- Sumich, J.L. & J.F. Morrissey (2004). Introduction to the biology of marine life (8<sup>th</sup> Ed.). Jones and Bartlett Publishers, 447 pp.
- Ter Braak, C.J.F. & P. Smilauer. (2002). CANOCO Reference manual and CanoDraw for Windows user's guide: Software for Canonical Community Ordination (version 4.5). Ithaca, Microcomputer Power, 500pp.
- Thiriot-Quéveux, C. & N. Ayraud (1982). Les caryotypes de quelques espèces de bivalves et de gastéropodes marins. *Marine Biology* 70(2): 165-172.
- Van den Brink, P.J., N.W. Van den Brink & C.J.F. Ter Braak. (2003). Multivariate analysis of ecotoxicological data using ordination: Demonstrations of utility on the basis of various examples. *Australasian Journal of Ecotoxicology* 9: 141-156.
- Vitturi, R., E. Catalano, M. Macaluso & B. ZAVA B. (1988). The karyology of *Littorina neritoides* (Linnaeus, 1758) (Mollusca, Prosobranchia). *Malacologia* 29 (2): 319-324.

**ANEXO**

# The effect of a wastewater treatment plant on *Littorina neritoides* population dynamics

J. Cabral-Oliveira<sup>a, \*</sup>, P. Maranhão<sup>b</sup>, M. A. Pardal<sup>a</sup>

<sup>a</sup> IMAR - Institute of Marine Research, Department of Zoology, University of Coimbra, 3004 - 517 Coimbra, Portugal

<sup>b</sup> IMAR – Institute of Marine Research, Escola Superior de Tecnologia do Mar, 2524 - 909 Peniche, Portugal

\* Corresponding author. E-mail address: [joanaco@ci.uc.pt](mailto:joanaco@ci.uc.pt) (J. Cabral-Oliveira)

## Abstract

*Littorina neritoides* (L. 1758) is a common intertidal gastropod that lives in crevices in the rocky shore. Aiming to fill the gap in the literature referring to population dynamics of this species in southern European coasts, between April 2004 and July 2005 two populations in the western coast of Portugal were monitored.

In order to assess the effect of a wastewater treatment plant discharging into the coast on *L. neritoides* population dynamics and secondary production, two close and similar shores were chosen to allow comparisons. Environmental data and *L. neritoides* abundance, biomass, population structure and annual growth production on the undisturbed (used as reference site) and on the disturbed/polluted shore were estimated.

The results show that abundance is higher in the disturbed area, explained by a massive settlement (more nutrients in the water produce more algae in the rocky surface enhancing benthic recruitment) in the lower level of the shore. However, a high mortality in this area approximates the density values of the upper levels in both shores.



It is hypothesized that a stressing chemical environment near the effluent of the wastewater treatment plant may cause this mortality. Densities in the upper levels of the disturbed shore are lower than expected and the adults seem to grow less when compared with the reference shore.

*Keywords:* *Littorina neritoides*, population dynamics, secondary production, wastewater treatment plant

## 1. Introduction

*Littorina neritoides* (L. 1758) is one of the most abundant species of the intertidal mesogastropods, but has not been the object of much recent studies. First studies were developed in United Kingdom (Lebour 1935; Lysaght 1941) and Italy (Patanè 1933). In the 70's and 80's were performed most of the studies: in North Wales, England, France, Maltese shores, Balearic Islands and Israel (Palant & Fishelson 1968; Daguzan 1976; Fretter & Manly 1977; Raffaelli & Hughes 1978; Hughes & Roberts 1980; 1981; Bosh & Moreno 1986; Grech & Schembri 1989). More recently, some studies were carried out in Ireland on the reproductive cycle (Cronin *et al* 2000; Cronin *et al* 2003) and population dynamics (Myers & McGrath 1993; McGrath 1997) and in the United Kingdom concerning aggregation behaviour and refuge mechanisms (Stafford & Davies 2004; 2005a; 2005b).

This species, typically live in crevices in rocky shores, which give protection against wave action, predation and/or desiccation (Fretter & Manly 1977; Raffaelli & Hughes 1978). Crevices increase the local density (Hughes & Roberts 1981) proving the preference of *L. neritoides* for this habitat. These organisms feed on algae and lichens present in the rock surface (Stafford & Davies 2005) and are able to hold extreme

physiological stress during low tides, surviving to desiccation for at least five months (Patanè 1933).

*Littorina neritoides* produces planktonic capsules, with a single egg that develops in a free veliger (Lebour 1935). The releasing of the capsules should occur only when individuals are submerged. Lysaght (1941) notice a fortnightly spawning rhythm, coincident with spring tides. In the Ireland coast maturity of individuals seem to be achieved in the period of Winter storms (Cronin *et al* 2000), specially in less exposed shores. Some authors (Lebour 1935; Palant & Fishelson 1968) refer a migration of females in the spawning season, but this has not been proved. Planktonic larvae then settle in the lower level of the rocky shore. The settlement depends on the larval survival in the water column, and on the favorable conditions of the rocky surface (Little & Kitching 1996). Snail's remain in the settlement site until achieve about 1mm, feeding on algae. Afterwards individuals start migrating upshore, exhibiting negative geotaxis (Fretter & Manly 1977). This migration up in the shore cause the size gradient characteristic of this species: shell size increase upshore (Lysaght 1941; Bosh & Moreno 1986). Growth rates decreases with age, being very slow in individuals with more than 6.0 mm (Lysaght 1941). Density is higher near the sea due to the presence of juveniles, and decrease upshore (Bosh & Moreno 1986).

In the present paper, we fill the gap in the literature referring the population dynamics of this species in southern European coasts. Moreover it is assessed the effect of a wastewater treatment plant (discharging an effluent without the full treatment into the coastal waters) on the population structure and secondary production.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Study Site

The sampling sites were located in Peniche peninsula (Fig. 1), on the western Portuguese coast (NUT III). Two shores were chosen, with nearly the same exposure and hydrodynamics, one undisturbed (reference) and other disturbed (polluted) receiving the effluent of a wastewater treatment plant. Both are calcareous shores facing approximately south. The source of stress/pollution is a wastewater treatment plant, which discharges water without the full treatment. This plant was constructed in 1998 and has primary and secondary treatment.

In each shore three vertical levels were delimited: L1 – lower shore; L2 – middle shore; L3 – upper shore. The sampling in the disturbed shore was carried out in a block with about six meters height above the sea (low tide). Each two meters corresponded to a sample level (L1, L2 and L3). In the reference shore L1 and L2 samples were done in small blocks, at the same tidal heights chosen for the disturbed shore. The sampling correspondent to the upper level was done in a wall with about 15 meters height.

### 2.2 Sampling

The monthly sampling was carried out from April 2004 to July 2005, excluding May and August 2004. Samples were collected placing three squares (15cmx15cm), randomly, at each of the three levels (L1, L2, L3) on each shore. The number of individuals collected varied from 4 to 925 per square. Salinity and pH were measured *in situ* and water samples were also collected for nutrient analyses and chlorophyll *a* quantification. Bacteriological analyses (Enterobacteriaceae, Coliforms, *E. coli* and *Pseudomonas*) were only performed in March 2005.

The nearby (1 km of distance) weather forecast of Cabo Carvoeiro provided the monthly precipitation and atmospheric temperature data. Sea water temperature data were obtained in the area of the port of Peniche (1.5 Km of distance).

### 2.3 Laboratory procedures

All individuals were counted and measured (maximum shell height). A total of 26 096 individuals were examined. Biomass was calculated as ash free dry weight (AFDW): individuals were dried at 60° C for four days, weighted, ignited in a muffle furnace at 450° for eight hours, and reweighed to determine the ash content.

Water samples were filtered (Whatman GF/F glass-fiber filter) and stored frozen at -18°C until analysis following standard methods described in [Limnologisk Metodik \(1992\)](#) for ammonia (NH<sub>3</sub>-N) and phosphate (PO<sub>4</sub>-P) and in [Strickland and Parsons \(1972\)](#) for nitrate (NO<sub>3</sub>-N) and nitrite (NO<sub>2</sub>-N). For determination of chlorophyll *a*, water samples were filtered and the extraction followed the protocol of [Parsons et al \(1985\)](#).

### 2.4 Data analysis

Population structure and growth was based on the observation of frequency distributions. Gastropoda density (ind.m<sup>-2</sup>) and biomass (g.m<sup>-2</sup>) data were average by sampling area and level. Biomass was estimated according to the conversion equation: biomass=0.00001x (shell height)<sup>3.3993</sup> (R<sup>2</sup>=0.9855; N=143).

Annual average secondary production was calculated using the size-frequency method modified by [Benke \(1979\)](#)

$$P = a \left[ \sum_{j=1}^{a-1} (\bar{N}_j - \bar{N}_{j+1}) \times \sqrt{(\bar{W}_j - \bar{W}_{j+1})} \right] \cdot \frac{365}{CPI}$$

Where  $\bar{N}_j$  is the mean density in size class  $j$  (ind.m<sup>-2</sup>);  $\bar{W}_j$  the mean individual weight in size class  $j$  (mg AFDW); CPI the cohort production interval, i.e. mean length of gastropoda life (days); and  $j$  and  $j+1$  the consecutive size classes ( $j=1,2,\dots,a$ ). We considered life time of *L. neritoides* between 5 and 7 years. The size classes (placed in the top or bottom of the correspondent column) with no individuals were ignored in the calculations.

A Redundancy Analysis (RDA) was used in order to evaluate the effect of the environmental parameters in the abundance and biomass of *L. neritoides* in the different sampling areas and dates. Computations were performed using CANOCO. Correlations – using STATISTICA program – between all environmental parameters were also calculated.

### **3. Results**

#### *3.1 Environmental data*

During the study period, pH showed higher variation in the disturbed site, oscillating from 7.63 to 8.79 (Table 1). Concerning the nutrients, the highest concentrations were found, in general, in the disturbed site. However, some peaks were detected: in both shores for all nutrients in June 2004; in the polluted shore for ammonia, phosphate and silica in September 2004 and for nitrites in February 2005. In general, chlorophyll *a* was higher in the reference shore (Table 1).

Concerning the mean atmospheric temperature and the sea water temperature, the lowest values were recorded in Winter (February 2005) and the maxima were recorded in Summer (August 2004). In relation to precipitation, the maximum value was recorded in October 2004 (689 mm) (Table 1).

Bacteriological analyses were performed in March 2005. The disturbed area presented values several orders of magnitude higher on Enterobacteriaceae, Coliforms, *E. coli* and *Pseudomonas* when compared to the reference site (Table 1).

### 3.2 *Littorina neritoides* abundance and biomass

Differences in total density and biomass were observed between shores (Fig. 2). *Littorina neritoides* is more abundant in the disturbed area than in the reference shore along all the 16 months of study (average of 2651 ind/m<sup>2</sup> in the reference area and 6043 ind/m<sup>2</sup> in the disturbed shore).

When analyzing the density by levels (Fig. 3) it was noticed that the abundance is similar at L2 and L3, being the differences more notorious at L1. At the disturbed site densities decrease sharply upshore but at the reference site the density is higher in L2 followed by L1 and than L3.

Total biomass is higher in the disturbed area in Fall and Winter but higher in the reference site in Spring and Summer (Fig. 2). Biomass in level L1 is bigger in the disturbed area than in the reference site all year around. The opposite pattern succeeded in level L3. In level L2 a similar pattern to the total biomass was observed: higher biomasses in Spring/Summer on the reference area and higher values in the disturbed shore in Fall/Winter.

The relation of total abundance and biomass of the gastropods with the environmental parameters was assessed by performing an RDA analysis (Fig. 4). The first two axis of the RDA performed using sampling areas and dates accounted for 48.8% of the total variance and 88.1% of the variance due to *L. neritoides* abundance-environmental relations. Among the environmental parameters considered only phosphate was significant.

Spatial differences (between shores) were detected (Fig. 4): reference shore is placed in the left side and the disturbed shore in the right side of the diagram. Considering the temporal gradient, the Spring and Summer months are placed in the lower quadrants, and Fall and Winter months are placed in the upper quadrants. The months of March, June, July, February, October and September in the disturbed shore are strongly correlated with ammonia, phosphate and silica concentrations.

### *3.3 Population structure and production*

The shell height frequency distributions of *L. neritoides* collected from each shore at each level during the sixteen-month were studied. Seasonal differences are shown in Fig. 5. The largest individual collected measure 8.408 mm in the reference shore and 6.586 mm in the disturbed. The smallest has 0.588 mm. In both shores the size of the individuals tends to increase from the lower level (L1) to the higher one (L3).

In the disturbed area the size of the individuals in the three levels is relatively constant along the year. Only in level L1 we observe smaller individuals in Summer 2005. On the contrary, in the reference shore the distribution of individuals by the size classes is much more dynamic between seasons. In Summer (2004 and 2005) L1 has the smaller individuals but L2 and L3 have some coincident size classes. From Autumn 2004 to Spring 2005 it is possible to observe, that L1 and L2 share more size classes and L3 has the bigger individuals.

When comparing the structure of the population between sampling areas (Fig. 6) it is possible to observe that smaller individuals were present in the disturbed shore and bigger snails in the reference coast. The shape of the histograms is also different. In the disturbed shore histogram there is a maximum in smaller classes sizes, and then an

accentuated decrease. In the reference area histogram it is possible to observe several local maximum.

In the disturbed area the graph is typical for a continuous recruitment, but that is not so evident in the reference site. However it was not possible to distinguish cohorts. A reproduction pulse was estimated in June/ September, being more evident in 2005 than in 2004, and in the reference area than in the disturbed area.

Referring to spawning, although not account in the present study capsules were found in almost all sampling dates being consistent to a continuous reproduction and recruitment all year around.

Annual growth production is higher in the polluted shore ( $1.7 \text{ g.m}^{-2}.\text{year}^{-1}$  in reference site and  $2.2 \text{ g.m}^{-2}.\text{year}^{-1}$  in the disturbed) while P/B ratio (0.9 in reference site and 1.1 in the disturbed) is similar (Tab. 2).

## **4. Discussion**

### *4.1 Environmental Data*

The presence of the wastewater treatment plant seems to influence the nutrients concentration and the amount of bacteria in the seawater. The peaks observed should be related with water discharges from the pollution source. In Table 3 are shown the standard values in the Basque Country (Spain) for ammonium, nitrate and phosphate, used as indicators referred in the Water Frame Directive (Bald *et al* 2005). In the present study the minimum values observed correspond to a high physico-chemical status and the maximum to a bad status. Those maximums correspond to the peaks noticed.

Chlorophyll *a* is higher (except in March 2005) in the reference shore, in opposition to what is expected: higher amount of phytoplankton should occur in the area



with more nutrient concentrations. Nevertheless, in the polluted shore large concentrations of bacteria were present (Tab. 1). Turbidity of the sea water is also higher in the area, which explains the lower amount of phytoplankton.

#### 4.2 *Littorina neritoides* abundance and biomass

Density is higher in the disturbed/polluted shore. The main difference occurs at level L1, which should be related with the juvenile benthic recruitment. The conditions of the rocky shore and the water column (larval survival) determine the settlement (Little and Kitching 1996). A higher quantity of nutrients in the polluted shore produces a higher quantity of algae in the rocky surface, in which *L. neritoides* feeds on. This could be attractive to the larvae, justifying L1 large densities.

Despite the significant difference in level L1 densities (average of 2.347 ind/m<sup>2</sup> in the reference area and 11.878 ind/m<sup>2</sup> in the disturbed area), in levels L2 and L3 the values are close in both shores (L2: 4.615 ind/m<sup>2</sup> in reference area and 5.073 ind/m<sup>2</sup> in the disturbed area; L3: 992 ind/m<sup>2</sup> in the reference area and 1.112 ind/m<sup>2</sup> in the disturbed area). Those values reflect a considerable high mortality at level L1 in the disturbed area. This mortality could be related with competition between the juveniles but also on the water characteristics since large quantities of deleterious bacteria are present in this area.

A large settlement in level L1 will increase intraspecific competition for food and space (Chen and Richardson, 1987). Moreover, level L1 is also the most instable level due to wave action. Therefore, the periwinkles start migrating upshore as soon as their size allows it (Fretter and Manly, 1977) searching for shelter (Lysaght 1941). At level L2 the number of crevices was limited. This poor shelter availability could cause a large mortality to the juveniles migrating upshore. But the carrying-capacity of the

habitat does not seem enough to explain all the mortality observed. Therefore, stressing chemical environment produced by the presence of the wastewater treatment plant is, probably, responsible for an important part of this high mortality, decreasing the number of juveniles that reach the adult phase.

Biomass is higher in Spring/Summer than in Fall/Winter. The polluted shore has superior values of biomass in level L1, which can be explain by the higher number of individuals. The reference shore has higher values of biomass in level L3. As the densities were similar in this level at both places the individuals should be bigger in the reference area. At level L2 a great biomass increase was observed in Spring/Summer, particularly in the non polluted shore. The lower biomass increase in the disturbed shore could be due to a lower growth rate of individuals, as a result of a stressing chemical environment.

The multivariate analysis corroborates the influence of the nutrients concentration on the disturbed shore. Higher concentrations of nitrate and nitrite appear in Spring and Summer samplings. Atmospheric and sea water temperature, pH and precipitation seem only to be temporal correlated (month samplings) but not spatially correlated (areas).

#### *4.3 Population structure and growth*

In both study areas shell size increase upshore. Settlement occurs in the lower level and the largest snails migrate up in the shore (Fretter and Manly 1977). In the reference shore the highest densities are at level L2. Level L1, being the most unstable, is just occupied by *L. neritoides* until they reach the size indispensable to migrate upshore (Fretter and Manly 1977). The oldest individuals were observed in level L3, at lower densities but larger in size. In the disturbed shore the highest densities are at level

L1, due to a significant settlement. From these juveniles only few achieve level L2. Like in the reference area, the oldest individuals occupy level L3. Individuals in L2 and L3 are bigger in the reference area. In the disturbed area *L. neritoides* has a huge settlement but than the individuals do not grow so much as in the reference shore.

Growth rates vary with population geographic location (Tab. 2) and decreases with age (Lysaght 1941). In the present study it was not possible to calculate these rates due to the absence of cohorts. But it seems that is more influenced by the local characteristics of the rocky shore than by the latitude (McGrath 1997). Settlement occurs during all year and a typical curve for continuous reproduction was observed, especially in the disturbed shore. *Littorina neritoides* shows continuous recruitment along all year, with a reproduction pulse in June – September. This is consistent with other studies developed (Tab. 2) where two settlement peaks were observed: one in March-June and another in September-October. The pulse observed on the present study was not so obvious like in the other studies. Being on the southern latitude (with more moderate temperatures) it can be assumed that the temperature increase is not so essential for the reproduction in Peniche populations. In Table 2 we can also detect a shortening of the spawning season at both ends of the latitude range. That had been remarked by Hughes & Roberts (1980) and should be explained by the influence of temperature in the spawning process.

Annual growth production was higher in the disturbed shore which could be explained by the huge settlement that occurs in level L1. However, those juveniles presented an elevated mortality. So, this higher annual growth production will not correspond to an effective population increase.

## 5. Conclusions

As a conclusion, it seems that the reference shore have a more stable population (less mortality with individuals reaching higher sizes and biomass). The disturbed shore, despite the considerable settlement, does not achieve higher densities like expected, and the adults seem to grow less. It is hypothesized that the stressing chemical environment produced by the presence of the wastewater treatment plant influences negatively the population of *L. neritoides*.

## References

- Bald, J., Borja, A., Muxika, I., Franco, J., Valência, V. 2005. Assessing reference conditions and physico-chemical status according to the European Water Framework Directive: A case-study from the Basque Country (Northern Spain). *Marine Pollution Bulletin* 50 1508–1522.
- Bosh, M., Moreno, I. 1986. Spatial distribution of *Littorina neritoides* (L. 1758) (Mollusca, Gastropoda) in the supralittoral zone in the Balearic Islands. *Cahiers de Biologie Marine*, 42: 53-62
- Chen, Y.S., Richardson, A.M.M. 1987. Factors affecting the size structure of two populations of the intertidal periwinkle *Nodilittorina unifasciata* (Gray, 1839) in the Derwent River, Tasmania. *Journal of Molluscan Studies* 53, 69–78.
- Cronin, M.A., Myers, A.A., O’Riordan, R.M. 2000. The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* on the west and south coasts of Ireland. *Biology and the Environment*, 100B, 2, 97-106
- Cronin, M. A., Myers, A.A., O’Riordan, R. 2003. The reproductive cycle of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* on Clare Island. *New Survey of Clare Island Vol. 3: Intertidal Marine Ecology* Ed. A. Myers. 133-143.

- Daguzan, J. 1976. Contribution a l'étude de la croissance et de la longévité de quelques littorinidae. Archives de Zoologie Experimentale et Générale 117, 57-80
- Fretter, V., Manly, R. 1977. Settlement and early benthic life of *Littorina neritoides* (L) at Wembury, S Devon. Journal of Molluscan Studies 43: 255-262
- Hughes, R.N., Roberts, D.J. 1980. Reproductive effort of winkles (*Littorina* spp.) with contrasted method of reproduction. Oecologia 47, 130-136
- Hughes, R. N., Roberts, D.J. 1980. Growth and reproductive rates of *Littorina neritoides* (L.) in north Wales. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 60, 591-9
- Hughes, R.N., Roberts, D.J. 1981. Comparative demography of *Littorina rudis*, *L. nigrolineata* and *L. neritoides* on three contrasted shores in North Wales. The Journal of Animal Ecology, 50(1), 251-268
- Grech, M, Schembri, P.J. 1989. A laboratory study of the behavioural responses of *Littorina neritoides* (Mollusca: Gastropoda) in relation to its zonation on Maltese shores (central Mediterranean). Marine Behaviour Physiology 15(2), 123-135
- Lebour, M.V. 1935. The breeding of *Littorina neritoides*. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom, 20 (2), 373-378
- Limnologisk Metodik 1992. Ferskvandsbiologisk Laboratorium. Kobenhavns Universitet (ed.), Akademisk Forlag, København, 172.
- Little C., Kitching, J.A. 1996. The biology of rocky shores. Oxford University Press. New York. 256 pp.
- Lysaght, A. 1941. The biology and trematode parasites of the gastropod *Littorina neritoides* (L.) on the Plymouth Breakwater. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 25, 41-67

- McGrath, D. 1997. Population structure and recruitment of the intertidal gastropod *Melarhaphe neritoides* (L.) on an exposed rocky shore on the south coast of Ireland. *Biology and Environment: Proceedings of the Royal Irish Academy*, 97B(1), 75-79
- Myers, A. A., McGrath, D. 1993. Settlement and growth of the intertidal gastropod *M. neritoides* on the south coast of Ireland. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 73, 313-19
- Palant, B., Fishelson, L. 1968. *Littorina punctata* and *M. neritoides* from Israel: ecology and annual cycle of the genital system. *Israel Journal of Zoology* 17, 145-60
- Patanè, L. 1933. Sul comportamento di *Littorina neritoides* L. Mantenuta in ambiente bobaero ed in altre condizioni sperimentali. *Rendiconti della Accademia dei Lincei*, (6) 17, 962-67
- Parsons, T. R., Maita, Y., Lally, C.M. 1985. Pigments. In: *A Manual of Chemical and Biological Methods for Seawater Analysis*. Pergamon Press, pp101-104
- Raffaelli, D.G., Hughes, R.N. 1978. The effect of crevice size and availability on populations of *Littorina rudis* and *Littorina neritoides*. *Journal of Animal Ecology* 47, 71-83
- Stafford R., Davies, M.S. 2004. Temperature and desiccation do not affect aggregation behaviour in high shore littorinids in north-east England. *Journal of Negative Results: Ecology and Evolutionary Biology*. 1, 16-20
- Stafford R., Davies, M.S. 2005. Examining refuge location mechanisms in intertidal snails using artificial life simulation techniques. *Lecture Notes in Artificial Intelligence. Proceedings of the VIIIth European Conference on Artificial Life*. 3630, 520-529

Stafford R., Davies, M.S. 2005. Spatial patchiness of epilithic biofilm caused by refuge-inhabiting high shore gastropods. *Hydrobiologia*. 545, 279-287

Strickland, J.D.H., Parsons, T.R. 1972. A practical handbook of seawater analysis (2<sup>nd</sup> Ed.). *Bulletin of the Fisheries Research Board of Canada* 167, 1-311

## FIGURE CAPTIONS

Fig. 1. Location of the sampling stations (R - reference and D - disturbed)

Fig. 2. (a) Density ( $\text{ind.m}^{-2}$ ) and (b) biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ ) in each of the sampling sites along the 16 months of study. ■ – reference; □ – disturbed

Fig. 3. Density ( $\text{ind.m}^{-2}$ ) and biomass ( $\text{g.m}^{-2}$ ) in each level (L1, L2 and L3) along the 16 months of study. ■ – reference; □ – disturbed

Fig. 4. Ordination diagram for the two canonical axis of the Redundancy Analysis performed using *Littorina neritoides* density and biomass values. (Sampling sites: R – reference and D - disturbed)

Fig. 5. The population structure of *Littorina neritoides* on the both shores (reference and disturbed) during the months April 2004 to July 2005. ■ – L1; □ – L2; ■ – L3

Fig. 6. Seasonal differences in the population structure of *Littorina neritoides*, on both shores. ■ – Disturbed shore; ■ – Reference shore

Table 1. Range of environmental parameters during the study period, in the two sampling places ( $\text{NO}_3^-$  – nitrate;  $\text{NO}_2^-$  – nitrite;  $\text{NH}_4^+$  – ammonia;  $\text{PO}_4^{3-}$  – phosphate; Si – silica; Chl *a* – chlorophyll *a*)

Table 2. *Littorina neritoides* growth rates, settlement and spawning season, annual growth production and P/B ratio estimations in different European populations along a latitudinal gradient

Table 3. Physico-chemical reference conditions of “high” and “bad” quality status





Fig. 1

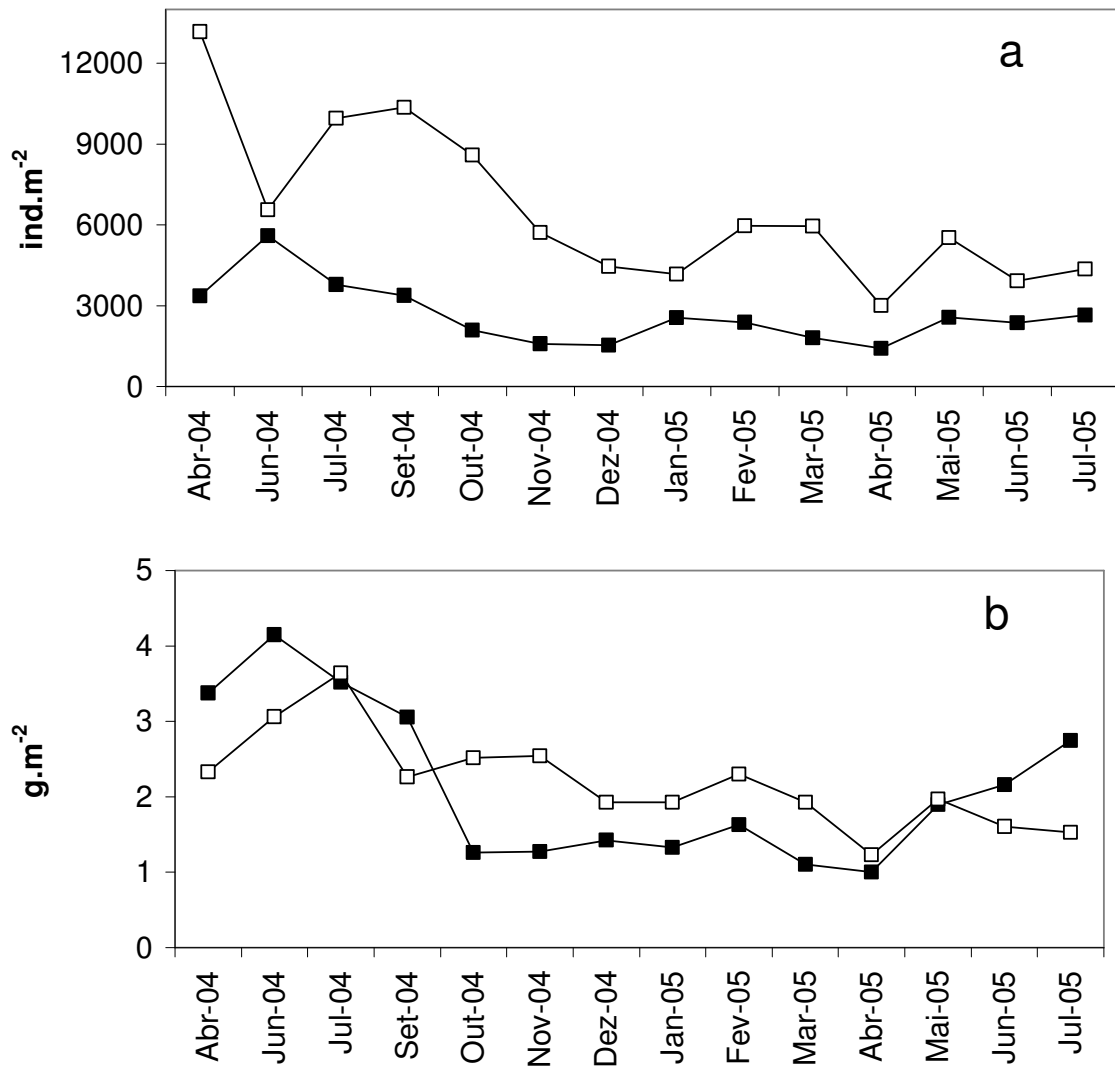


Fig. 2

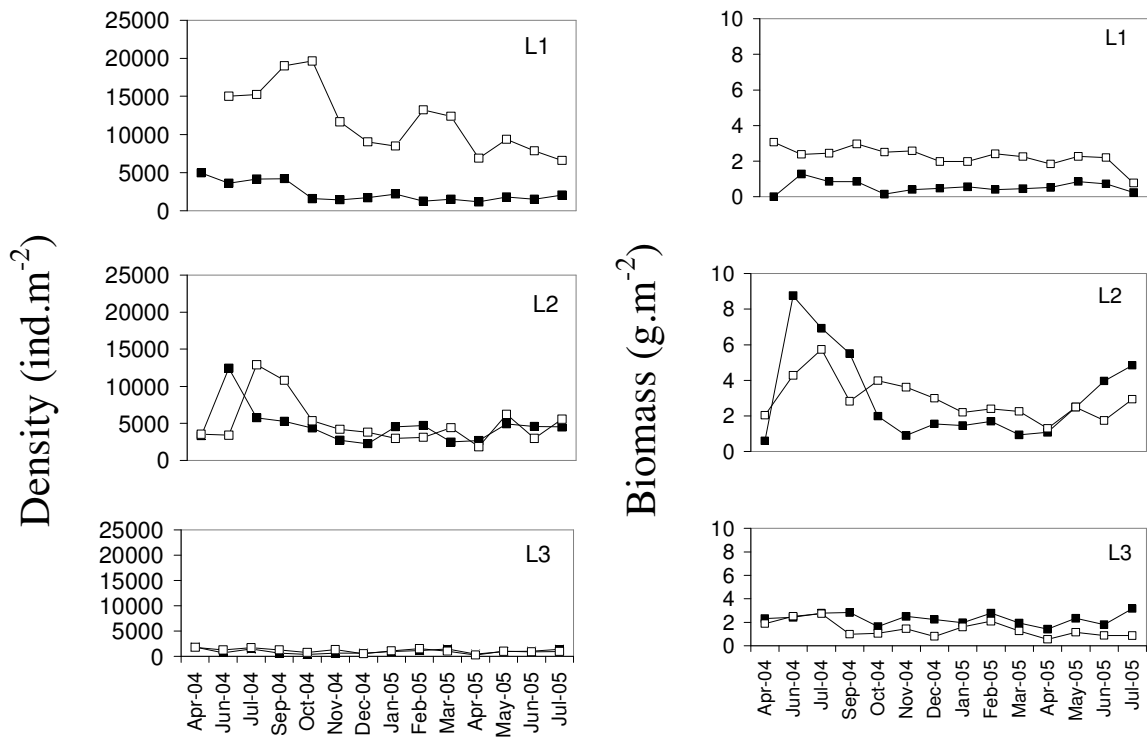


Fig. 3

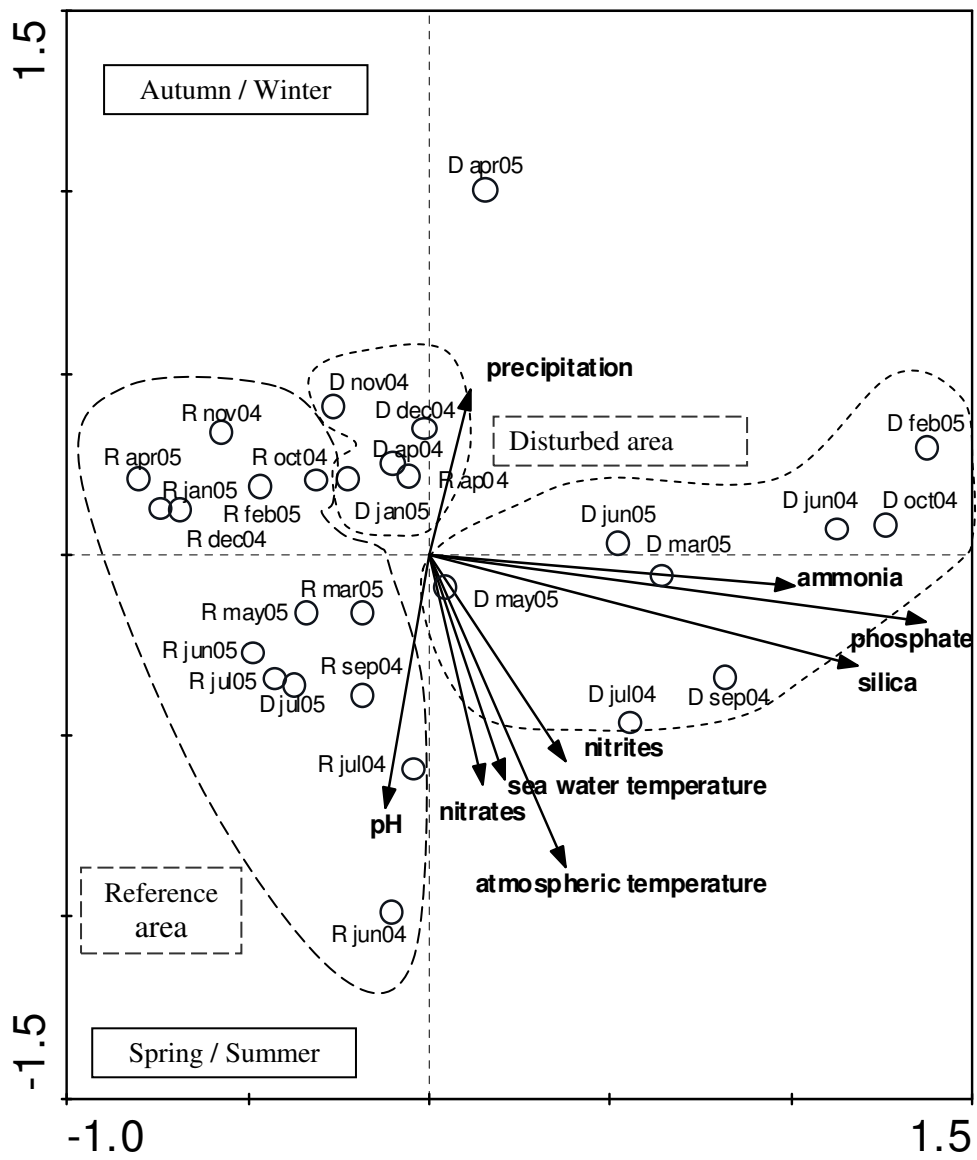


Fig.4

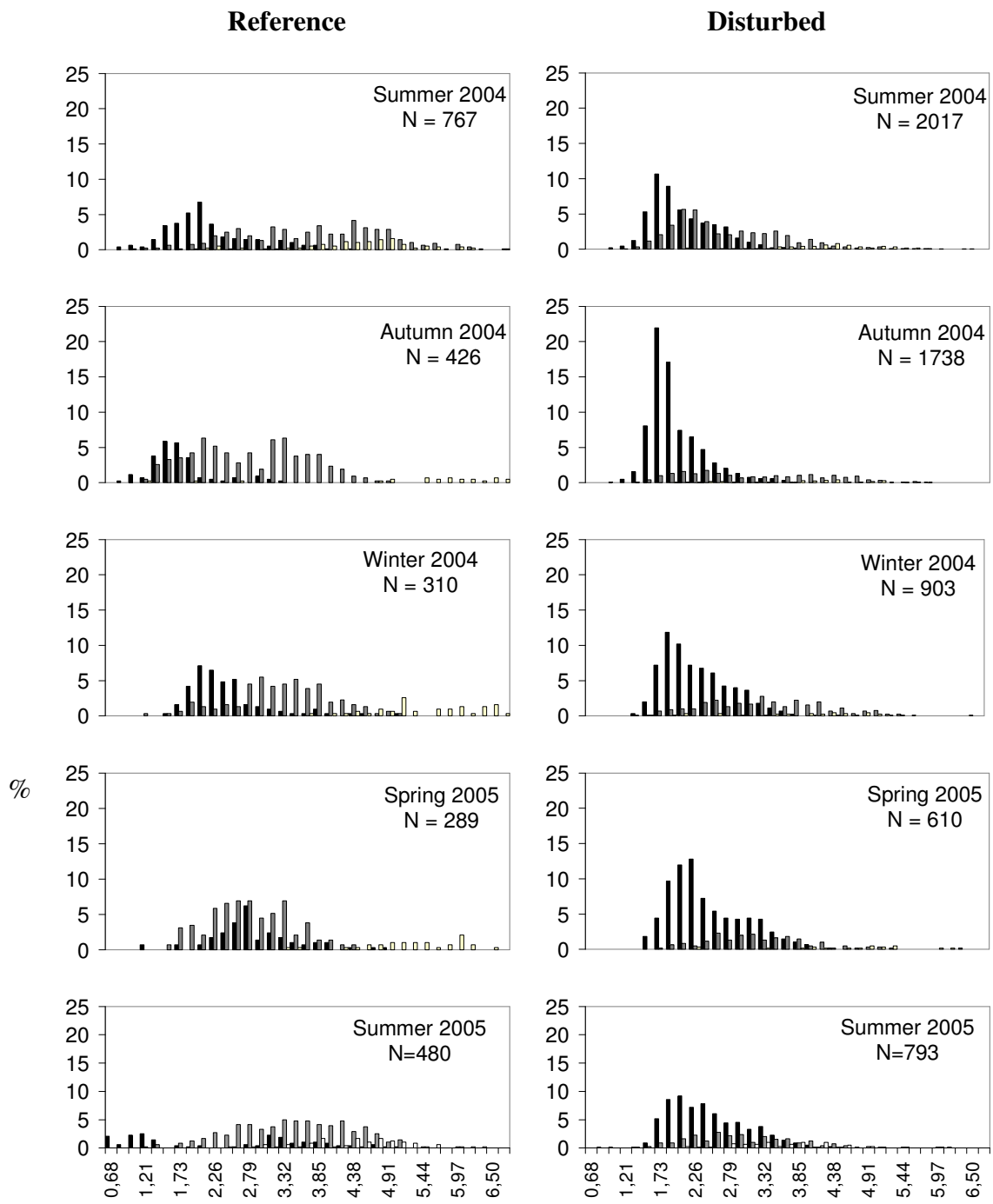


Fig. 5

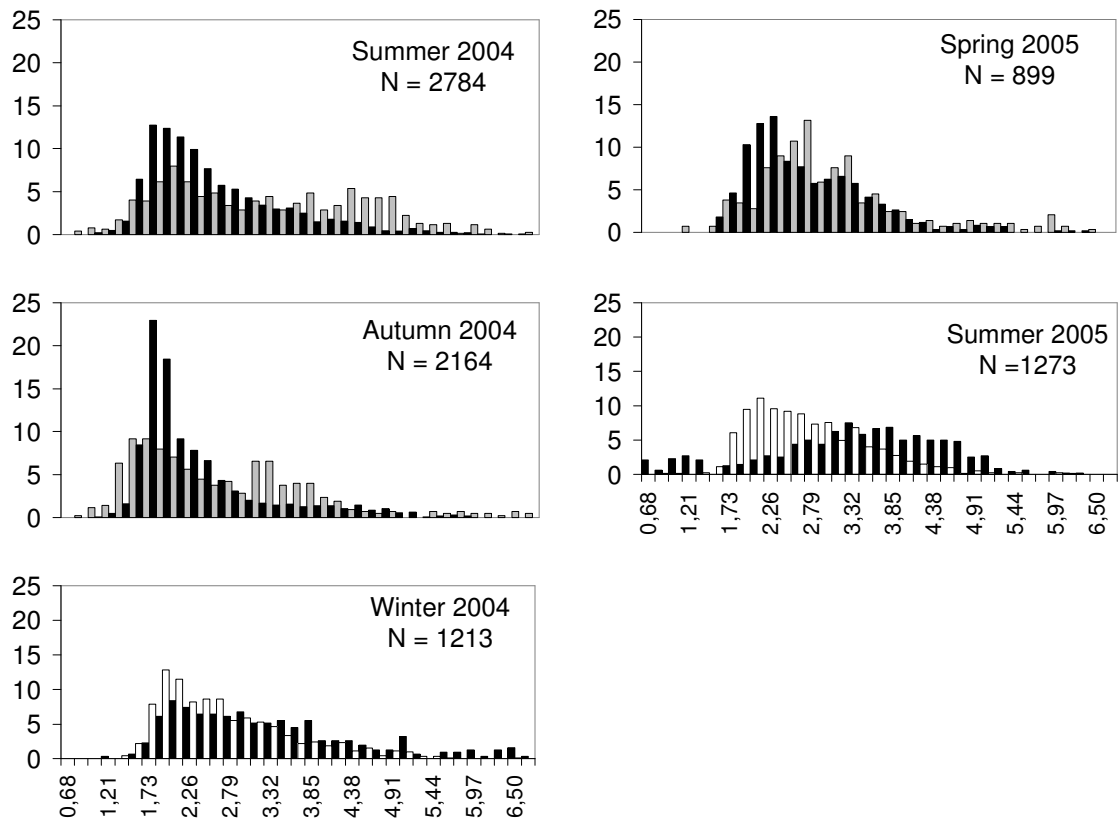


Fig. 6

Table 1

	Reference			Disturbed		
	Min	Max	Average $\pm$ SD	Min	Max	Average $\pm$ SD
Air temp ( $^{\circ}$ C)	10.46	20.43	15.77 $\pm$ 3.06	10.46	20.43	15.77 $\pm$ 3.06
Sea water temp ( $^{\circ}$ C)	13.03	19.58	16.25 $\pm$ 1.85	13.03	19.58	16.25 $\pm$ 1.85
pH	7.73	8.52	8.18 $\pm$ 0.199	7.63	8.79	8.07 $\pm$ 0.306
NO <sub>3</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.009	28.55	2.04 $\pm$ 7.34	0.153	7.73	0.765 $\pm$ 1.94
NO <sub>2</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.002	3.518	0.292 $\pm$ 0.896	0.079	1.232	0.239 $\pm$ 0.286
NH <sub>4</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.0013	2.663	0.223 $\pm$ 0.692	0.041	41.33	5.87 $\pm$ 12.47
PO <sub>4</sub> (mg.L <sup>-1</sup> )	0.003	1.327	0.104 $\pm$ 0.339	0.041	4.451	0.99 $\pm$ 1.56
Si (mg.L <sup>-1</sup> )	0.063	0.941	0.179 $\pm$ 0.212	0.084	2.066	0.455 $\pm$ 0.63
Chl <i>a</i> (mg.m <sup>-3</sup> )	0.208	5.765	1.828 $\pm$ 1.511	0.081	2.355	0.906 $\pm$ 0.657
Enterobacteriaceae (cfu/mL)		0.06			31.6	
Coliforms (cfu/mL)		0.075			89	
<i>E. coli</i> (cfu/mL)		0.375			> 300	
<i>Pseudomonas</i> (cfu/mL)		0.8			135	

Table2

Location	Growth rate	Settlement season	Spawning season	P g.m <sup>-2</sup> .year <sup>-1</sup>	P/B	References
Ireland (Clare Island)	—	—	Sept – Feb	—	—	Cronin <i>et al</i> 2000
Ireland (Carnsore Point)	Shell height of 2mm achieved in 5 months	Jun settlement event confirmed	—	—	—	McGrath, 1997
Ireland North Wales	— Shell height of 2mm achieved in 9 months	—	Oct – Jun —	—	—	Dorman 1986 Hughes and Roberts 1980
North Wales	—	—	Mar – June (1977) Jan – June (1978)	—	—	Hughes & Roberts 1980
England (Plymouth)	Decreases with age	—	September – April	—	—	Lysaght 1941
England (Plymouth)	—	All year (exp. Jan) Max: Mar/Apr, Sept/Oct	Sept – Apr	—	—	Fretter & Graham 1980 (in McGrath 1997)
England (Devon, Wembury)	—	All year Max: Mar/Apr, Sept/Oct	—	—	—	Fretter & Mainly 1977
France (Brittany)	Shell height of 3mm achieved in 7 months	—	—	—	—	Daguzan 1976
Present study	—	All year Max: Jun/Sept	—	Ref: 1.8 Pol: 2.3	Ref: 1.0 Pol: 1.1	
Israel	—	—	Dec – Apr	—	—	Palant & Fishelson 1968



Table 3

	Ammonia (mg.l <sup>-1</sup> )	Nitrate (mg.l <sup>-1</sup> )	Phosphate (mg.l <sup>-1</sup> )
High physico-chemical status	0.036	0.310	0.042
Bad physico-chemical status	0.28	0.800	0.100