

Utilización de biotransformados de *Laminaria saccharina* (L.) Lamouroux en la alimentación de la semilla de la almeja *Ruditapes decussatus* (L., 1758)

A. Pérez Camacho¹, J. M. Salinas², C. Fuertes² y M. Delgado¹

¹ Centro Oceanográfico de A Coruña. Instituto Español de Oceanografía. Muelle de Ánimas, s/n. E-15001 A Coruña, España. Correo electrónico: alejandro.perez@co.ieo.es

² Centro Oceanográfico de Santander. Instituto Español de Oceanografía. Apdo. 240. E-39080 Santander (Cantabria), España

Recibido en julio de 2001. Aceptado en febrero de 2002.

RESUMEN

En este estudio se desarrolla una técnica de producción de biotransformados de *Laminaria saccharina* (L.) Lamouroux basada en la acción secuencial de enzimas (endoglucanasas y celulasas) y dos bacterias aisladas en laboratorios del Instituto Español de Oceanografía: las cepas códigos CECT-5255 y CECT-5256 de la CECT, que presentan una alta actividad celobiosica, proteolítica y alginolítica. Con dicha técnica, la harina de *L. saccharina* se transforma en una suspensión de células libres y detritos algales de tamaño inferior a 20 µm, perfectamente capturables y digeribles por los moluscos bivalvos.

Los diversos ensayos realizados en la alimentación de semilla de la almeja *Ruditapes decussatus* (L., 1758) ponen de manifiesto que con este biotransformado de *L. saccharina*, utilizado como único alimento, se obtienen crecimientos de alrededor del 40 % del logrado con fitoplancton. Si se mezcla con fitoplancton, puede sustituir hasta el 90 % del alimento vivo obteniéndose crecimientos equivalentes, incluso superiores, a los de las dietas algales puras.

Palabras clave: Biotransformado, células detriticas, *Laminaria saccharina*, alimentación, cultivo, *Ruditapes decussatus*.

ABSTRACT

Use of single-cell detritus (SCD) produced from *Laminaria saccharina* (L.) Lamouroux in feeding *Ruditapes decussatus* (L., 1758) seed clam

A production technique for single cell detritus (SCD) from *Laminaria saccharina* (L.) Lamouroux was developed based on the sequential action of two enzymes, endoglucanases and cellulases, and two bacteria isolated in our laboratories: CECT-5255 and CECT-5256, which have high levels of cellobiosic, proteolytic and alginolytic activity. Using this technique, *L. saccharina* meal is transformed into a suspension of algal cells and detritus of less than 20 µm in diameter, which can easily be filtered and digested by bivalve molluscs.

A feeding trial carried out with *Ruditapes decussatus* (L., 1758) seed clams showed that *L. saccharina* SCD, when used as their sole diet, got 40 % of the seed growth achieved with a microalgal diet (control diet). When the SCD was used in a mixed diet, it could substitute up to 90 % of the microalgae, with comparable or even higher growth rates than exclusive microalgal diets.

Keywords: Single cell detritus (SCD), detrital cells, *Laminaria saccharina*, feeding, culture, *Ruditapes decussatus*.

INTRODUCCIÓN

En la década de los 80 se pusieron a punto distintos métodos para obtener protoplastos de macroalgas, en diferentes especies de los géneros *Laminaria*, *Macrocystis* y *Sargasun* (Polne-Fuller, Saga y Gibor, 1986) y *Fucus* (Kloareg y Quatrano, 1987). En general, estas técnicas combinaban la acción de celulasas, pectinasas, alginato-liasas y otros enzimas extraídos de diferentes moluscos (Kloareg y Quatrano, 1987; Kloareg, Polne-Fuller y Gibor, 1989) y bacterias marinas aisladas de las frondas en deterioro de macroalgas marinas (Boyen *et al.*, 1990).

En esta misma línea, Uchida (1996) utiliza las propiedades degradadoras de la bacteria marina *Alteromonas espejiana* Chan *et al.*, 1978 para producir detritos protoplasmáticos a partir de *Laminaria japonica* Areschoug. Uchida y Numaguchi (1996) aplican esta técnica para producir células detríticas (SCD) a partir de *Ulva pertusa* Kjellman y comprueban que estas partículas son ingeridas sin dificultad por las larvas de la almeja *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850), por lo que sugieren la posibilidad de utilizar SCD de macroalgas para la producción de animales suspensivos en criadero. Igualmente, Uchida, Nakata y Maeda (1997), utilizan SCD procedente de talos de *Laminaria japonica* para alimentar nauplios de *Artemia salina* Linnaeus 1758.

Diversos autores han planteado la importancia de los detritos orgánicos en la alimentación de los bivalvos (Fraga y Vives, 1960; Cabanas *et al.*, 1979; Navarro *et al.*, 1996), habiéndose comprobado que los organismos suspensivos pueden absorber estos detritos (Stuart, Field y Newell, 1982; Charles, 1993) y que las tasas de aclaramiento y la eficiencia de absorción de dichos organismos alcanzan sus valores máximos con dietas mixtas, integradas por fitoplancton vivo y detritos orgánicos (Navarro *et al.*, 1996); simultáneamente, las tasas de crecimiento aumentan con la presencia en el alimento de detritos de macroalgas bénticas (Duggins, Simenstad y Estes, 1989).

En España, actualmente, la tecnología de producción de semilla de moluscos está desarrollada a escala industrial en algunas especies de almejas y, en menor medida, en ostra plana *Ostrea edulis* Linnaeus, 1758. No obstante, la capacidad de producción de alimento es un factor limitativo de relieve importante en la producción de semilla en

criadero, a la par que el coste de producción de fitoplancton representa uno de los principales costes de explotación de los criaderos industriales de bivalvos (Persoone y Claus, 1980; De Paw, 1981). Con esta perspectiva, la sustitución total o parcial de las microalgas en la alimentación de bivalvos, constituye una de las expectativas más interesantes para la mejora de los criaderos de estos moluscos. Dentro de esta línea, nuestro grupo ha realizado diferentes estudios sobre la dieta de los moluscos bivalvos cultivados en criadero que han permitido la sustitución de entre el 50 % y el 75 % del fitoplancton por diversos tipos de harinas de cereales y de algas macrofitas. En los últimos años se ha ido avanzando en la puesta a punto de técnicas que permiten producir protoplastos y células aisladas mediante la degradación de diferentes especies de macroalgas (Kloareg y Quatrano, 1987; Uchida, 1996; Uchida, Nakata y Maeda, 1997). Dado el interés de estos estudios, nuestros trabajos más recientes se han centrado en el aislamiento de especies bacterianas que tengan una elevada actividad sobre los polisacáridos estructurales de diferentes algas pardas y en el desarrollo de un biotransformado (SCD) a partir de harina de *Laminaria saccharina* para su utilización como alimento de la semilla de almeja fina *Ruditapes deussatus*.

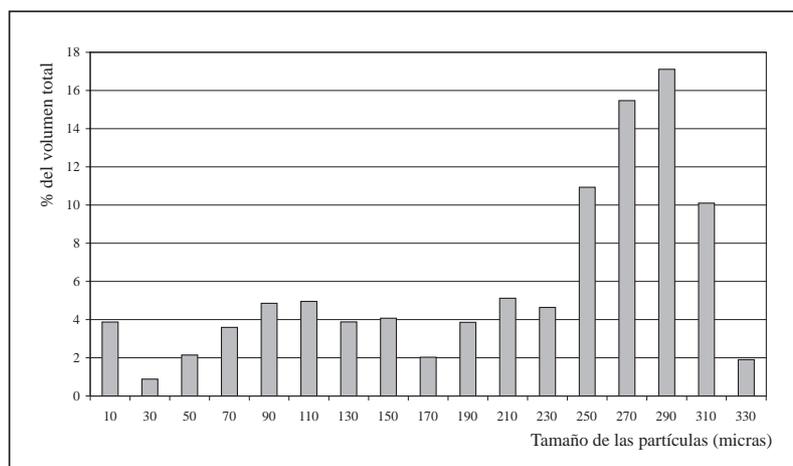
MATERIAL Y MÉTODOS

Elaboración del biotransformado de algas (SCD)

Obtención de las algas y elaboración de la harina base

Las algas se obtienen por cultivo intensivo en suspensión basado en la siembra de gametofitos maduros sobre hilo de semilla en colector, inducción a la gametogénesis y fecundación, obtención de embriones y, finalmente, plántulas que serán desprendidas de los colectores por tratamiento ultrasónico. Posteriormente se procede a su cultivo en suspensión en tanques escalados desde 500 hasta 45 000 l. Alcanzada la talla de 600 mm, se realiza un tratamiento de hipernitrogenación con cloruro amónico durante 24-48 h para aumentar la concentración de proteína. Finalmente, los lotes son secados a baja temperatura y molidos hasta obtener partículas de menos de 350 μm (figura 1).

Figura 1. Distribución de tallas (dimensión mayor) de las partículas de la harina de *Laminaria saccharina* (en % del volumen total).



Tratamiento enzimático y activación bacteriana

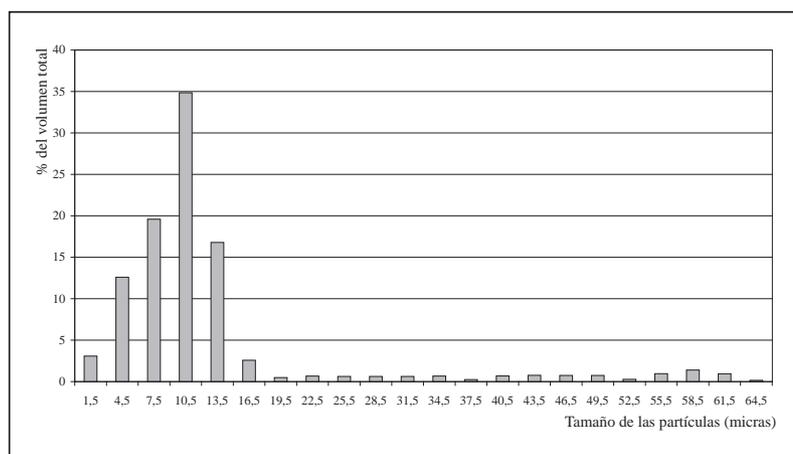
La harina base, en una proporción del 10 % peso/volumen, se somete a un tratamiento previo de hidratación con secuestrantes de iones calcio y a un posterior ataque con un complejo enzimático de endoglucanasas y celulasas, a pH 5,4 y 37 °C durante 24 h. La reacción se controla por valoración enzimática de la glucosa generada. La activación bacteriana final se obtiene por siembra de las cepas de códigos CECT-5255 y CECT-5256 de la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), aisladas en el Centro Oceanográfico de Santander del Instituto Español de Oceanografía (IEO), que presentan una alta actividad celobiósica, proteolítica y alginolítica. El proceso se realiza en biorreactor a 27 °C, con control de pH a 7,8, agitación constante y aireación estéril durante 24-48 horas; al concluir, más del 85 % de la biomasa del SCD corresponde a partículas de diámetros comprendidos entre 3 µm y 20 µm (figura 2). Posteriormente, el SCD se almacena en bolsas de cierre hermético en cámara

frigorífica, previa valoración de peso seco y desactivación bacteriana con EDTA.

Experiencias con semilla

Se utilizó semilla procedente del laboratorio del Centro Oceanográfico de A Coruña del IEO. Las experiencias, con duración de 3 a 4 semanas, se realizaron en recipientes de policarbonato de 6 l, con 3 l de agua de mar filtrada a 1 µm y esterilizada con rayos UV. El agua se renovaba todos los días y el alimento se suministraba diluido en un litro de agua, por recipiente y día, mediante una bomba peristáltica multicanal, dosificado en 4 tomas de 15 minutos y a intervalos de 6 horas. Diariamente se determinó la ingestión de alimento mediante un contador de partículas Coulter y semanalmente se determinó la mortalidad, la longitud y el peso vivo (PV) de las almejas, después de escurrirlas sobre papel secante durante 5 minutos.

Figura 2. Distribución de tallas (dimensión mayor) de las partículas de SCD de *Laminaria saccharina* (en % del volumen total).



Como dieta de referencia se utilizó *Isochrysis galbana* Parke, en ración diaria del 2 % (en peso orgánico) del PV de las almejas. Esta ración es considerada como la de crecimiento máximo para esta especie con este tipo de alimento (Pérez Camacho et al., 1998; Albentosa et al., 1998).

Experimento 1

De cuatro semanas de duración y destinado a establecer los valores de referencia de las dietas fitoplanctónicas puras en raciones por debajo de la de crecimiento máximo, se ensayaron en él 3 condiciones de alimento, con 3 réplicas por tratamiento. Tratamiento A: 2 % del PV de las almejas de *Isochrysis galbana*; tratamiento B: 1 % de *I. galbana*; tratamiento C: 0,2 % de *I. galbana*. Cada réplica estaba compuesta por 1 g (PV) de almejas, que presentaban un PV medio de 37,5 mg.

Experimento 2

Desarrollado durante tres semanas con la finalidad de determinar la dieta diaria de biotransformado más adecuada, se ensayaron en él 4 condiciones de alimento, con 3 réplicas por tratamiento. Tratamiento A: 2 % del PV de las almejas de *Isochrysis galbana*; tratamiento B: 2 % de harina de *Laminaria saccharina* tratada con enzimas y bacterias (biotransformado); tratamiento C: 4 % de biotransformado; tratamiento D: 8 % de biotransformado. Cada réplica estaba compuesta por 1 g (PV) de almejas, con una longitud media de 5,8 mm y un PV medio de 26,92 mg.

Experimento 3

Destinado a estudiar el comportamiento del biotransformado de *Laminaria saccharina* como sustitutivo parcial del fitoplancton, y durante cuatro semanas, se ensayaron en él 3 condiciones de alimento y 4 réplicas por tratamiento. Tratamiento A: 2 % del PV de las almejas de *Isochrysis galbana*; tratamiento B: 2 % de harina de *Laminaria saccharina* tratada con enzimas y bacterias (biotransformado); tratamiento C: 1,8 % de biotransformado y un 0,2 % de *Isochrysis galbana*. Cada réplica estaba

compuesta por 1 g (PV) de almejas de una longitud media de 4,0 mm y un PV medio de 16,18 mg.

Métodos estadísticos

El efecto sobre el crecimiento del tamaño inicial de la semilla, analizado mediante un análisis de varianza multifactorial y utilizando como covariable el tamaño inicial, no resultó significativo ($P > 0,796$). A la vista de la relación directa existente entre la media y la desviación típica, se empleó la transformación logarítmica de los valores de PV para garantizar la homogeneidad de las varianzas (Lison, 1968). Con los valores expresados en porcentaje se utilizó la transformación angular. Las diferencias entre tratamientos se analizaron con la prueba de rango múltiple, por el método de las menores diferencias significativas (Snedecor y Cochran, 1971; Zar, 1974). Los análisis de varianza (Anova), pruebas de rango múltiple y las comparaciones de las líneas de regresión entre diferentes variables se analizaron utilizando el paquete estadístico Statgraphics®.

RESULTADOS

El crecimiento de las almejas del experimento 1 está reflejado en la figura 3, donde se representan los valores medios de cada tratamiento. Como puede verse, el PV de las almejas aumenta conforme se incrementa la ración ofrecida y así, al término de los 28 días del experimento, las almejas de la ración A (*I. galbana*, 2 %) presentaron un incremento medio de 31,38 mg, las de la ración B (*I. galbana*, 1 %) de 22,03 mg y las de la ración C (*I. galbana*, 0,2 %) de 11,23 mg; esto representa para las dietas B y C, respectivamente, crecimientos del 70,2 % y del 35,8 % del crecimiento obtenido con la dieta A. Los PV se relacionan con el tiempo según las ecuaciones exponenciales que se describen en la tabla I. La comparación de las líneas de regresión entre el logaritmo de PV y el tiempo pone de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre las pendientes de todas ellas ($P < 0,001$). En todos los casos la mortalidad fue inferior al 10 % y las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas (Anova; $P > 0,05$).

Los resultados del segundo experimento (figura 4) reflejan un mayor crecimiento de las almejas alimentadas con fitoplancton vivo frente a las que re-

Figura 3. Crecimiento de la semilla de *Ruditapes decussatus* alimentada con raciones diarias del 2 %, 1 % y 0,2 % de su peso vivo de *Isochrysis galbana*.

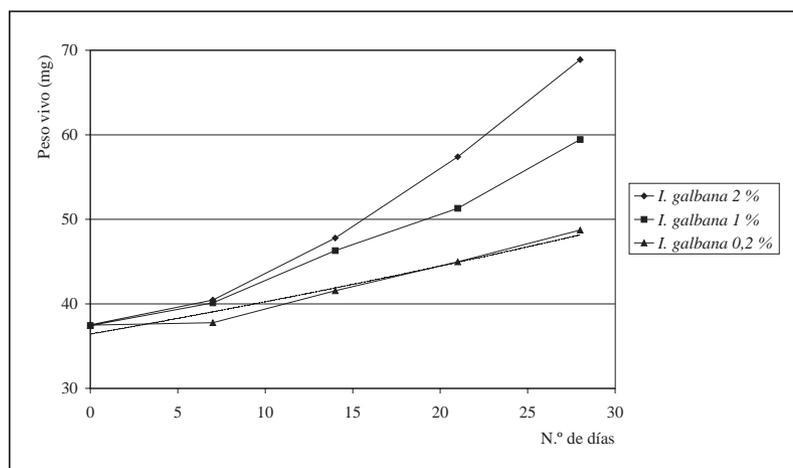


Tabla I. Parámetros de las líneas de regresión $Y = e^{a+bX}$, entre el peso vivo Y (mg) y el tiempo X (número de días) de la semilla de *Ruditapes decussatus* alimentada con raciones diarias del 2 %, 1 % y 0,2 %, respecto al peso vivo de las almejas ($n = 15$), de *Isochrysis galbana* (materia orgánica). (c.c.): coeficiente de correlación; (P): probabilidad en el Anova. Se expresan los valores \pm el error estándar.

Ración	2 %	1 %	0,2 %
a	$3,5595 \pm 0,0162$	$3,5847 \pm 0,0125$	$3,5902 \pm 0,0205$
b	$0,0223 \pm 0,0014$	$0,0169 \pm 0,0007$	$0,0098 \pm 0,0011$
c.c.	$0,9760 \pm 0,0529$	$0,9892 \pm 0,0266$	$0,9304 \pm 0,0419$
P	0,0000	0,0000	0,0000

cibieron diferentes raciones de SCD de *L. saccharina*, con diferencias mucho más patentes cuando el crecimiento se mide en peso vivo que cuando se estima en longitud (tabla II). De esta manera, al término de la experiencia, las almejas alimentadas con raciones diarias de SCD de *L. saccharina* en 2 %, 4 % y 6 % presentaron un incremento del 43 %, 45 % y 54 %, respectivamente, respecto al incremento correspondiente a las almejas alimentadas con fitoplancton vivo. Los incrementos de PV de las almejas de los cuatro tratamientos muestran diferencias estadísticamente significativas (Anova; $P = 0,0001$).

El test de rango múltiple indica diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la dieta A y todas las de-

Tabla II. Crecimiento en peso vivo (PV) y longitud (L) de semilla de *Ruditapes decussatus* alimentada con raciones diarias de *I. galbana* del 2 % de su peso vivo, y de SCD de *L. saccharina* en el 2 %, 4 % y 6 %. (d.e.): desviación estándar.

Dieta	PV (mg)	d.e.	L (mm)	d.e.
<i>I. galbana</i> 2 %	60,19	6,21	6,82	0,18
SCD 2 %	38,50	2,41	5,94	0,11
SCD 4 %	39,56	1,29	6,07	0,10
SCD 6 %	43,87	3,06	6,24	0,12

más, mientras que las diferencias entre las dietas B, C y D no son estadísticamente significativas. En todos los casos la mortalidad fue inferior al 10 % y las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas (Anova; $P > 0,05$).

Al final de la tercera experiencia, las almejas del tratamiento A (*I. galbana*, 2 %) tenían un PV medio de 1,84 g y longitud media de 5,30 mm; las del B (SCD de *L. saccharina*, 2 %), 1,34 g de PV y 6,64 mm de longitud y las del C (20,2 % de *I. galbana* y 1,8 % de SCD de *L. saccharina*), 1,92 g y 5,55 mm, para el PV y la longitud, respectivamente. Los incrementos medios diarios de PV, transformados logarítmicamente para homogeneizar las varianzas, muestran diferencias significativas entre los distintos tratamientos (Anova; $P = 0,0001$). El test de rango múltiple señala diferencias significativas ($P < 0,05$) entre la dieta C y el grupo formado por las dietas A y C, dentro del cual no hay diferencias significativas (figura 5). En todos los casos, la mortalidad fue inferior al 10 % y las diferencias entre tratamientos no resultaron significativas (Anova; $P > 0,05$).

DISCUSIÓN

El resultado del presente estudio pone en evidencia que el biotransformado de *L. saccharina* es un buen complemento del fitoplancton en la alimentación de la semilla de *R. decussatus*. Hasta ahora no conocemos ninguna referencia a la utilización SCD de *L. saccharina*, u otra especie de macroalga, en la alimentación de moluscos bivalvos, si se exceptúa el trabajo de Uchida y Numaguchi (1996), que se limitaba a constatar que las larvas de la almeja *Ruditapes philippinarum* pueden ingerir SCD

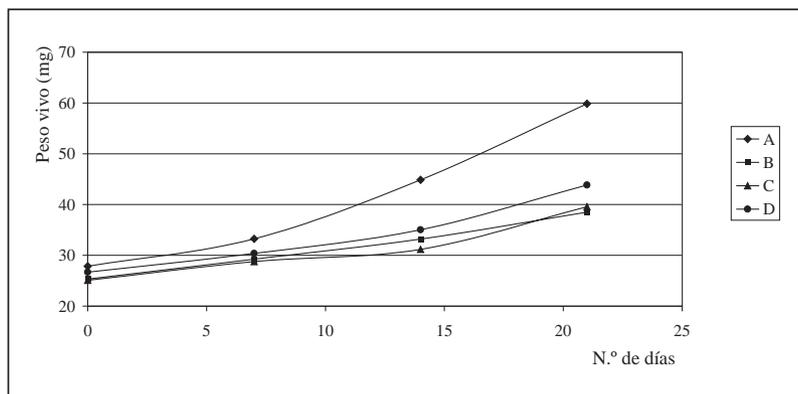


Figura 4. Crecimiento de la semilla de *Ruditapes decussatus* alimentada con raciones diarias del 2% de su peso vivo de *Isochrysis galbana* (A), del 2% (B), del 4% (C) y del 6% (D) de SCD de *Laminaria saccharina*.

de *Ulva pertusa*. En otros invertebrados marinos, únicamente Uchida, Nakata y Maeda (1997) han utilizado SCD de *L. saccharina* para alimentar nauplios de artemia, y con resultados prometedores.

En nuestro caso, el biotransformado esta producido por la acción secuencial de enzimas y de dos bacterias aisladas en el Centro Oceanográfico de Santander del IEO: las cepas con códigos CECT-5255 y CECT-5256. El ataque enzimático tiene por finalidad romper las paredes celulares de polisacáridos y las fibras de celulosa. La bacteria CECT-5255 es *Pseudoalteromonas espejiana* (Chan et al. 1978) Gauthier et al. 1995, de marcada actividad alginolítica, semejante a la aislada por Uchida (1996) de los talos de *Laminaria japonica*; la CECT-5256 es un *Vibrio* marino, de especie desconocida hasta la fecha, que presenta una extraordinaria capacidad para hidrolizar polisacáridos complejos. Estos dos microorganismos actúan sinérgicamente, llegando a degradar sustratos casi inalterables, pero respetando los fosfolípidos de la membrana celular. Esta característica les permite transformar harina de laminaria, el 83% de cuya biomasa está integrada por fragmentos de 100 a 350 µm y difícilmente ingeribles por las almejas, en un SCD en el que el 90% de la biomasa tiene un diámetro inferior a las 20 m, integrado por

pequeñas partículas detriticas individuales, aglomerados de bacterias y partículas detriticas y células algales libres sin pared celulósica (figura 5).

Este tratamiento es mucho más efectivo que el descrito por Uchida (1996), pues permite partir de fragmentos de laminaria de mucho mayor tamaño y produce un SCD con un mayor porcentaje de biomasa por encima de las 3 m, tamaño a partir del cual la retención de partículas por las branquias de los bivalvos se aproxima al 90% (Jørgensen, 1990). La observación microscópica de las heces de las almejas de los experimentos 2 y 3 y el cálculo por cómputo con Coulter de la ingestión de partículas, permiten confirmar que el SCD de *L. saccharina* es ingerido por *R. decussatus* en porcentajes semejantes a los de *I. galbana*.

El proceso de obtención de SCD descrito en este artículo, además de reducir considerablemente el tamaño de las partículas de la harina de *L. saccharina* haciéndolas accesibles al aparato digestivo de las almejas, aumenta también su digestibilidad, como pone de manifiesto el hecho de que cuando se alimenta la semilla de *R. decussatus* con harina de macroalgas sin tratar, el crecimiento en PV no supera el 15% del obtenido con fitoplancton puro (Albentosa y Pérez Camacho, 2002), frente a incre-

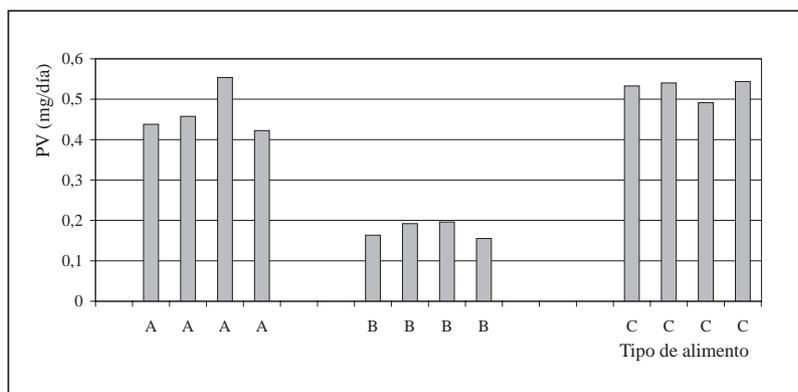


Figura 5. Incremento medio diario del peso vivo (PV) de *Ruditapes decussatus* alimentada con *Isochrysis galbana* (A), SCD de *Laminaria saccharina* (B) y la mezcla de ambas (C).

mentos medios del 37 % al 45 % que se obtienen cuando las almejas se alimentan exclusivamente con biotransformado de *L. saccharina* (figuras 4 y 5). Como se pone en evidencia en la experiencia 2, las diferencias de crecimiento que se obtienen con raciones de SCD de *L. saccharina* del 2 % al 6 % no varían significativamente, por lo que la ración al 2 % de peso seco de biotransformado se puede considerar como la más indicada en la alimentación de la semilla de almeja fina.

Las propuestas de sustitución del fitoplancton vivo por diferentes alimentos alternativos son muy variadas. Distintos autores han utilizado fitoplancton con diferentes procedimientos de secado para alimentar moluscos bivalvos, y, aunque Langdon y Önal (1999) describen crecimientos equivalentes en semilla de *Mytilus galloprovincialis* Lamarck, 1819 alimentada con fitoplancton vivo y seco, cuando este alimento se suministra a ostras o almejas, el fitoplancton seco necesita el complemento de, al menos, el 20 % de fitoplancton vivo (Curatolo, Ryan y Mercer, 1993; Laing y Millican, 1992; Albentosa *et al.*, 1997). Este porcentaje equivale, en valor absoluto y en el mejor de los casos, a una ración de fitoplancton vivo 3 o 4 veces superior a la empleada en este estudio (Laing y Millican, 1992) con resultados equivalentes. También se han utilizado distintos tipos de microcápsulas para sustituir al fitoplancton vivo, con resultados, en general, poco satisfactorios por el escaso crecimiento obtenido, elevado coste, alta sedimentación, proliferación de bacterias, pérdida de nutrientes y poca digestibilidad (Langdon y Bolton, 1984; Chu *et al.*, 1987). Epifanio (1979), con dietas con el 50 % de levadura y el 50 % de fitoplancton, consigue crecimientos en *Argopecten irradians* Lamarck 1819, *Mytilus edulis* Linnaeus, 1758 y *Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758) comparables a los del 100 % de fitoplancton. Pérez Camacho *et al.* (1998) y Albentosa *et al.* (1998) obtienen resultados semejantes sustituyendo el 50 % de fitoplancton vivo por harina de maíz y de trigo, respectivamente.

Los resultados del presente estudio demuestran que el biotransformado de *L. saccharina* puede sustituir el 90 % de fitoplancton vivo en la alimentación de *R. decussatus*, con crecimientos equivalentes, incluso superiores, a los de las dietas fitoplanctónicas vivas. Si a esto se añade la baja sedimentación de este producto, la ausencia de proliferación de bacterias patógenas en los tanques de cultivo (como posible resultado del control ejercido por las bacterias propias del biotransformado) y la alta supervivencia

de los especímenes utilizados en las experiencias, se puede concluir que el SCD de *L. saccharina* es uno de los mejores alimentos complementarios de las dietas fitoplanctónicas vivas para *R. decussatus* y que su utilización permitiría reducir en el 90 % las necesidades de producción de fitoplancton en los criaderos industriales de moluscos bivalvos. Igualmente, el empleo de este alimento permitiría reducir de forma apreciable los costes de explotación de este tipo de industrias, en las que el cultivo de fitoplancton entraña el 30 % de los costes totales de producción (Coutteau y Sorgeloos, 1992).

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos la asistencia técnica prestada por C. Fernández Pena y Helena Regueiro. Este estudio ha sido llevado a cabo dentro del proyecto "Desarrollo de biotransformados de algas marinas especialmente adaptados para la alimentación de moluscos bivalvos", financiado por MCYT-IEO (ACU00-001).

BIBLIOGRAFÍA

- Albentosa, M., M. J. Fernández-Reiriz, A. Pérez Camacho y U. Labarta. 1998. Growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* (L.) spat fed on microalgal and wheatgerm flour diets. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 232 (1): 23-37.
- Albentosa, M. y A. Pérez Camacho. 2002. Valor nutritivo de harinas de macroalgas para el cultivo de semilla de almeja japonesa *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850): pruebas preliminares. En: *VIII Congreso nacional de acuicultura: Acuicultura y desarrollo sostenible* (22-25 de mayo, 2001. Santander, Cantabria, España). I. Arnal Atarés *et al.* (eds.) *Boletín. Instituto Español de Oceanografía* 18(1-4): 281-287.
- Albentosa, M., A. Pérez Camacho, U. Labarta y M. J. Fernández-Reiriz. 1997. Evaluation of freeze-dried microalgal diets for the seed culture of *Ruditapes decussatus* using physiological and biochemical parameters. *Aquaculture* 154: 305-321.
- Boyen, C., Y. Bertheau, T. Barbeyron y B. Kloareg. 1990. Preparation of guluronate lyase from *Pseudomonas algino-vora* for protoplast isolation in *Laminaria*. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 885-889.
- Cabanas, J. M., J. J. González, A. Pérez Camacho y G. Román. 1979. Estudio del mejillón y de su epifauna asociada en los cultivos flotantes de la Ría de Arosa. III: Observaciones previas sobre la retención de partículas y la biodeposición de una batea. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía* 5: 45-50.
- Charles, F. 1993. Utilización of fresh detritus derived from *Cystoseira nmediterranea* and *Posidonia oceanica* by the de-

- posit-feeding bivalve *Abra ovata*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 174: 43-64.
- Chu, F. L. E., K. L. Webb, D. A. Hepworth y B. B. Casey. 1987. Metamorphosis of larvae of *Crassostrea virginica* fed microcapsulated diets. *Aquaculture* 64: 185-199.
- Coutteau, P. y P. Sorgeloos. 1992. The use of algal substitutes and the requirements for live algae in the hatchery and nursery rearing of bivalve molluscs: an international survey. *J. Shellfish Res.* 11 (2): 467-476.
- Curatolo, A., M. M. Ryan y A. P. Mercer. 1993. An evaluation of performance of Manila clam spat (*Tapes philippinarum*) feed on different rations of spray-dried algae (*Tetraselmis suecica*). *Aquaculture* 112: 179-186.
- De Pauw, N. 1981. Use and production of microalgae as food for nursery bivalves. En: *Nursery Culturing of Bivalve Molluscs. Especial Publication*. C. Claus, N. de Pauw y E. Jaspers (eds.) 7: 35-69. European Mariculture Society. Ostende, Bélgica.
- Duggins, D. O., C. A. Simenstad y J. A. Estes. 1989. Magnification of secondary production by kelp detritus in coastal marine ecosystems. *Science* 245: 170-173.
- Epifanio, C. E. 1979. Comparison of yeast and algal diets for bivalve molluscs. *Aquaculture* 16: 187-192.
- Fraga, F. y F. Vives. 1960. Retención de partículas orgánicas por el mejillón de los viveros flotantes. En: *Reunión sobre Producción Marina y Explotación Pesquera* 4: 71-73. Instituto de Investigaciones Pesqueras. Vigo, España.
- Jørgensen, C. B. 1990. *Bivalve filter feeding: Hydrodynamics, bioenergetics, physiology and ecology*. Olsen & Olsen. Fredensborg, Dinamarca: 140 pp.
- Kloareg, B., M. Polne-Fuller y A. Gibor. 1989. Mass production of viable protoplasts from *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. (Phaeophyta). *Plant Science* 62: 105-112.
- Kloareg, B. y R. S. Quatrano. 1987. Enzymatic removal of the cell walls from zygotes of *Fucus distichus* (L.) Powell (Phaeophyta). *Hydrobiologia* 151-152: 123-129.
- Laing, I. y P. F. Millican. 1992. Indoor nursery cultivation of juvenile bivalve molluscs using diets of dried algae. *Aquaculture* 102: 231-243.
- Langdon, C. J. y E. T. Bolton. 1984. A microparticulate diet for a suspension-feeding bivalve molluscs *Crassostrea virginica* (Gmelin). *Journal of Marine Ecology* 82: 239-258.
- Langdon, C. y E. Önal. 1999. Replacement of living microalgae with spray-dried diets for the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Aquaculture* 180: 283-294.
- Lison, L. 1968. *Statistique appliquée à la Biologie expérimentale*. Gauthier-Vilar. París: 346 pp.
- Navarro, E., J. I. P. Iglesias, A. Pérez Camacho y U. Labarta. 1996. The effect of diets of phytoplankton and suspended bottom material on feeding and absorption of raft mussels (*Mytilus galloprovincialis* Lmk.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 198: 175-189.
- Pérez Camacho, A., M. Albentosa, M. J. Fernández-Reiriz y U. Labarta. 1998. Effect of microalgal and inert (cornmeal and cornstarch) diets on growth performance and biochemical composition of *Ruditapes decussatus* seed. *Aquaculture* 160: 89-102.
- Persone, G. y C. Claus. 1980. Mass culture of algae, a bottleneck in the nursery culturing of molluscs. En: *Algal Biomass*. G. Shelefy y C. J. Soeder (eds.): 265-285. Elsevier. Amsterdam.
- Polne-Fuller, M., N. Saga y A. Gibor. 1986. Algal cell, callus and tissue cultures and selection of algal strains. *Beih. Nov. Hedwigia* 83: 30-36.
- Snedecor, G. W. y W. C. Cochran. 1971. *Métodos estadísticos*. Continental. Buenos Aires: 703 pp.
- Stuart, V., J. G. Field y R. C. Newell. 1982. Evidence for absorption of kelp detritus by the ribbed mussel *Aulacomya* after using a new Cr-labelled microsphere technique. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 9: 263-271.
- Uchida, M. 1996. Formation of Single Cell Detritus densely covered with bacteria during experimental degradation of *Laminaria japonica* Thalli. *Fisheries Science* 62 (5): 731-736.
- Uchida, M., K. Nakata y M. Maeda. 1997. Introduction of detrital food webs into an aquaculture system by supplying single cell algal detritus produced from *Laminaria japonica* as a hatchery diet for *Artemia nauplii*. *Aquaculture* 154: 125-137.
- Uchida, M. y K. Numaguchi. 1996. Formation of protoplasmic detritus with characteristics favorable as food for secondary animals during microbial decomposition of *Ulva pertusa* (Chlorophyta) frond. *Journal of Marine Biotechnology* 4: 200-206.
- Zar, J. H. 1974. *Bioestatistical Analysis*. Prentice-Hall. Englewood Cliffs. Nueva Jersey: 620 pp.