

**CULTIVO DE JUVENILES DE *Gigartina canaliculata* HARV.,
CON ESTIERCOL DIGERIDO DE VACA**

**CULTURE OF *Gigartina canaliculata* HARV. JUVENILE GERMLINGS,
BY MEANS OF MEDIA ENRICHED WITH DIGESTED COW MANURE**

Isaí Pacheco Ruiz*
Zaúl García Esquivel*
Luis E. Aguilar**

*Instituto de Investigaciones Oceanológicas (I.I.O.)
Universidad Autónoma de Baja California, Ensenada, Baja California, México.

**Centro de Investigaciones de Quintana Roo (CIQRO)
Apdo. Postal 886, Cancún, Quintana Roo, México.

Pacheco Ruiz Isaí, García Esquivel, Z. y Aguilar R., L.E. Cultivo de juveniles de *Gigartina canaliculata* Harv., con estiércol digerido de vaca. Culture of *Gigartina canaliculata* Harv. juvenile germlings, by means of media enriched with digested cow manure. *Ciencias Marinas* 13(2);51-58.

RESUMEN

Tetrasporofitos juveniles de *Gigartina canaliculata* fueron cultivados con éxito durante ocho semanas usando estiércol de vaca como nutrientes. Se utilizaron cuatro diferentes concentraciones de la solución de biodigerido como fuente de nutrientes. Se encontró que 120 y 160ml de solución por litro de agua de mar fue el óptimo para el crecimiento, similar al obtenido usando el medio de Von Stoch.

Se concluye que el estiércol digerido de vaca es un buen generador de nutrientes para cultivo de *G. canaliculata* a nivel experimental, además de que resulta mucho más económico que los medios tradicionales.

ABSTRACT

Tetrasporophyte germlings of *Gigartina canaliculata* were cultivated with success during eight weeks using digested cow manure as nutrients source. Four different concentrations of the biodigested solution were used (40, 80, 120 and 160 ml/l of seawater). It was found that 120 and 160ml of solution per liter of seawater was the best for growth, similar to the one obtained with the Von Stoch media.

Cow manure as a nutrient source for seaweed culture results much more economical than traditional media.

INTRODUCCION

El agua de mar enriquecida es la base para la preparación de muchos medios de cultivo, tales como el de Von Stoch (1963), Provasoli (1968) y otros.

INTRODUCTION

Enriched seawater serves as the basis for the preparation of many culture media such as Von Stoch's (1963), Provasoli's (1968) and others.

Independientemente de lo complejo del medio y de la efectividad que tenga, uno de los aspectos que requiere la atención, sobre todo en los países en vías de desarrollo, es utilizar medios económicos, ya que por lo general los medios tradicionales se hacen con reactivos especiales que se obtienen de casas comerciales a precios muy elevados (Granados y Bückle, 1984). Consecuentemente, cultivar con estos medios resulta caro, ocasionando que la investigación se limite a países desarrollados o a instituciones con presupuestos muy altos.

Una puerta que se abre para bajar los costos de este tipo de investigación es el utilizar excrementos de animales como fuente de nitrógeno.

Harlin *et al.* (1978) consideran precisamente al excremento de peces como una fuente de nitrógeno para el cultivo de algas. Más recientemente, Asare (1980) utiliza como fuente de nitrógeno estiércol de oveja y conejo al cultivar dos especies de algas rojas. Sin embargo, la utilización de medios de cultivo basado en nutrientes originados con estiércol de vaca y tratados en particular con biodigestores apropiados es un campo totalmente nuevo en la investigación. Granados y Bückle (*op. cit.*) dejan establecida una técnica para obtener nutrientes a partir de estiércol de animales. Ellos aplicaron esta técnica con dos especies de microalgas y obtuvieron resultados similares a los medios tradicionales.

La aplicación de esta tecnología puede ser una alternativa para disminuir los costos de investigación en los cultivos de vegetales marinos en general. Por lo anterior, en el presente trabajo se pretende observar la respuesta de crecimiento en estadíos juveniles de la carragenofita *Gigartina canaliculata* cultivada con nutrientes obtenidos en base a la descomposición líquida aeróbica de estiércol de vaca.

MATERIALES Y METODOS

Estiércol fresco de vaca fue colectado en una granja en las afueras de la ciudad de Ensenada, BC. Una vez colectado se procedió a poner estiércol en los biodigestores. El diseño de éstos y la metodología de tratamiento que

Besides the complexity of the media and its efficiency, one of the aspects that needs being taken care of, particularly in the developing countries, is the use of economical media since the traditional ones are usually carried out with special reactivities obtained on the market at very high prices (Granados and Bückle, 1984). Consequently, the culture using these media is expensive and causes the research to be restricted to developed countries or to institutions with a very high budget.

One way of diminishing the costs of this kind of research is to use animal waste as nitrogen source.

Harlin *et al.* (1978) consider fish waste as nitrogen source for the algae culture. More recently Asare (1980) uses sheep and rabbit manure as nitrogen source for the culture of two species of red algae. However, the use of culture media based on nutrients coming from the cow manure and treated with appropriate biodigestors constitutes a completely new field in research. Granados and Bückle (*op. cit.*) elaborated a technique to obtain nutrients from animal manure. They applied this technique working with two microalgae species and produced results similar to the ones obtained with traditional media.

The application of this technology may be an alternative to decrease the cost of research in the culture of marine plants in general. That is why our objective is to observe the growth response in juveniles of the carragenophyte, *Gigartina canaliculata* cultivated with nutrients obtained from the aerobic liquid decomposition of cow manure.

MATERIALS AND METHODS

Fresh cow manure was collected in a farm outside Ensenada, BC. Then, we put the manure in the biodigestors. Their design and the methodology of treatment was made according to Granados and Bückle (1984). On the sixth day, when the nutrients concentration was optimum in the extract (Table I), we obtained the liquor. The latter was sterilized

Tabla I. Relación de la concentración de nutrientes (mg/l) para el medio control (V. Stoch) y medio orgánico (estiércol digerido) utilizados en los experimentos.**Table I.** Presentation of the nutrients concentration (mg/l) for the control (V. Stoch) and organic (digested cow manure) media used in the experiments.

V.Stoch*	Licor de estiércol**	Stock (M ₁)	Stock (M ₂)	Stock (M ₃)	Stock (M ₄)
NO 42.5	357	0.01480	0.03100	0.04860	0.06800
PO 4.14	84	0.00350	0.00730	0.01140	0.01600
Fe 0.28	3	0.00012	0.00026	0.00041	0.00057
Mn 2.23	10	0.00041	0.00087	0.00136	0.00190
NH 0.146	38	0.00158	0.00330	0.00518	0.00723

* Von Stoch, 1963

** Granados y Bückle (1984)

se siguió fue la de Granados y Bückle (1984), hasta obtener el licor al sexto día que es cuando la concentración de nutrientes es óptima en el extracto (Tabla I). El licor se esterilizó en una autoclave (15lb/cm² y 121°C) a pH bajo (4.5) con el fin de excluir bacterias y conservar las vitaminas. Además, se realizó un análisis químico (Strickland y Parsons, 1977) de los medios orgánicos (Tabla I).

Del extracto se añadieron diferentes cantidades: 40, 80, 120 y 160ml/l de agua de mar, para preparar las soluciones stock, correspondientes a M₁, M₂, M₃ y M₄ respectivamente (Tabla I). El medio utilizado como control fue el Von Stoch (1963). La salinidad fue ajustada a 33‰ en todos los medios.

Para el cultivo se utilizaron 60ml de cada solución stock y se pusieron en matraces Erlenmeyer de 125ml. En cada matraz se colocaron 15 juveniles de *Gigartina canaliculata*, cuya longitud promedio fue de 6.35mm ±3.34 ($\alpha = 0.05$) con una edad aproximada de 4.5 meses. Los experimentos se hicieron por duplicado y se mantuvieron en una incubadora marca Precisión, con fotoperíodo y temperatura controlados (12:12 y 18°C ±1). La iluminación para el cultivo fue de 0.9 x 10¹⁵ Quanta cm⁻² seg⁻¹, generada por lámparas de

in an autoclave (15lb/cm² and 121°C) with low pH (4.5) to eliminate bacteria and maintain the vitamins.

From the extract, different quantities were added: 40, 80, 120 and 160ml/l of seawater, to prepare the stock solutions, corresponding to M₁, M₂, M₃ and M₄ respectively. The control medium was Von Stoch's (1963). The salinity was adjusted to 33‰ in all media.

Sixty millilitres of each stock solution were used for the culture and put into Erlenmeyer glass flasks of 125ml. In each of them, we put 15 *Gigartina canaliculata* juveniles whose average length was 6.35mm ±3.34 ($\alpha = 0.05$) and approximate age 4.5 months. The experiments were duplicated and maintained in a Precision incubator, with controlled photoperiod and temperature (12:12 and 18°C ±1). The light for the culture was of 0.9 x 10¹⁵ Quanta cm⁻² sec⁻¹ generated by white light lamps integrated in the incubators. The measures of the length of the organisms were made with a Vernier (±0.1mm) every two weeks during eight weeks, renewing the cultivation medium at the same time. When a ramification was produced on a plant, its length was added to the total length of the specimen.

luz blanca integradas en la incubadora. Las mediciones de longitud de los organismos se realizaron con un Vernier ($\pm 0.1\text{mm}$) cada dos semanas durante ocho semanas renovándose el medio de cultivo al mismo tiempo. Cuando en alguna planta se observó ramificación, la longitud de ésta se sumó a la longitud total del ejemplar.

El análisis estadístico consistió en la comparación de la longitud promedio de los juveniles mediante un análisis de varianza (ANOVA) (Ryan, Joiner y Ryan, 1976) teniendo como factor los distintos medios de cultivo. Con el fin de comparar medios individuales se utilizó la prueba de Tukey para comparaciones múltiples (Zar, 1984). Las decisiones se consideraron significativas a un $\alpha = 0.05$, y altamente significativas a un $\alpha = 0.01$.

RESULTADOS Y DISCUSION

Todos los ejemplares contenidos en los matraces con diferentes medios crecieron en ambos experimentos. En vista de lo anterior, se procedió a comparar los resultados en los dos experimentos aplicándose previamente una prueba F para probar homogeneidad de varianzas entre los pares de muestras (Sokal y Rohlf, 1979), es decir, entre los medios y sus réplicas. Las pruebas t demostraron que no hubo diferencias significativas entre las medias de los M₁, M₂ y M₄ ($\alpha = 0.05$). Un análisis más detallado indicó que a un nivel de confianza del 96% y 97% respectivamente, esas diferencias observadas no se mantienen. En vista de que los resultados para los experimentos 1 y 2 no fueron significativamente distintos, se conjuntaron los datos para generar las gráficas de crecimiento y la formulación de las pruebas de hipótesis.

Las curvas de crecimiento para los juveniles de *G. canaliculata* en el medio Von Stoch y en los otros medios preparados a partir del biodigerido de vaca pueden observarse en la figura 1. En general, el incremento en la talla de los organismos parece guardar una relación lineal con el tiempo durante las primeras seis semanas de monitoreo, experimentando un repentino aumento en la tasa de crecimiento para las subsecuentes dos semanas, que es cuando comenzaron a ramifi-

The statistical analysis consisted in comparing the average length of the juveniles through the analysis of the variance (ANOVA) (Ryan, Joiner and Ryan, 1976), considering the different cultivation media. For multiple comparisons of individual media, the Tukey test was used (Zar, 1984). The decisions were considered significant at $\alpha = 0.05$ and highly significant at $\alpha = 0.01$.

RESULTS AND DISCUSSION

All the specimens contained in the glass flasks with different media grew in both experiments. That is why we compared the results in both experiments after testing the variance homogeneity between the pairs of samples (Sokal and Rohlf, 1979), that is between the media and their replicas (Test F). The t tests showed that there were no significant differences between the media of M₁, M₂ and M₄ ($\alpha = 0.05$). A more detailed analysis indicated that at a liability level of 96% and 97% respectively, these differences do not persist. Since the results of the experiments 1 and 2 were not significantly different, we combined the data to generate the growth curves and to formulate the hypothesis tests.

The growth curves of *G. canaliculata* juveniles in the Von Stoch media and other media prepared using the biodigested cow manure may be observed on figure 1. In general the size increase of the organisms seems to keep a lineal relation with time during the first six weeks of monitoring and suddenly increases during the next two weeks, when the specimens started to ramificate. This follows the logistic curve model (Odum, 1977). These differences may be due to the fact that the plants are between the induction and the exponential phase. A variance analysis (ANOVA) for a growth comparison using plantules subject to different treatments, showed that there are highly significant differences between the different media. Thus, applying the Tukey test for multiple comparisons, we determined that the organic media with a maximum concentration of biodigested waste (M₃ and M₄) did not present significant differences in relation with the witness (Von Stoch) nor between themselves. But they proved to be significantly different from the

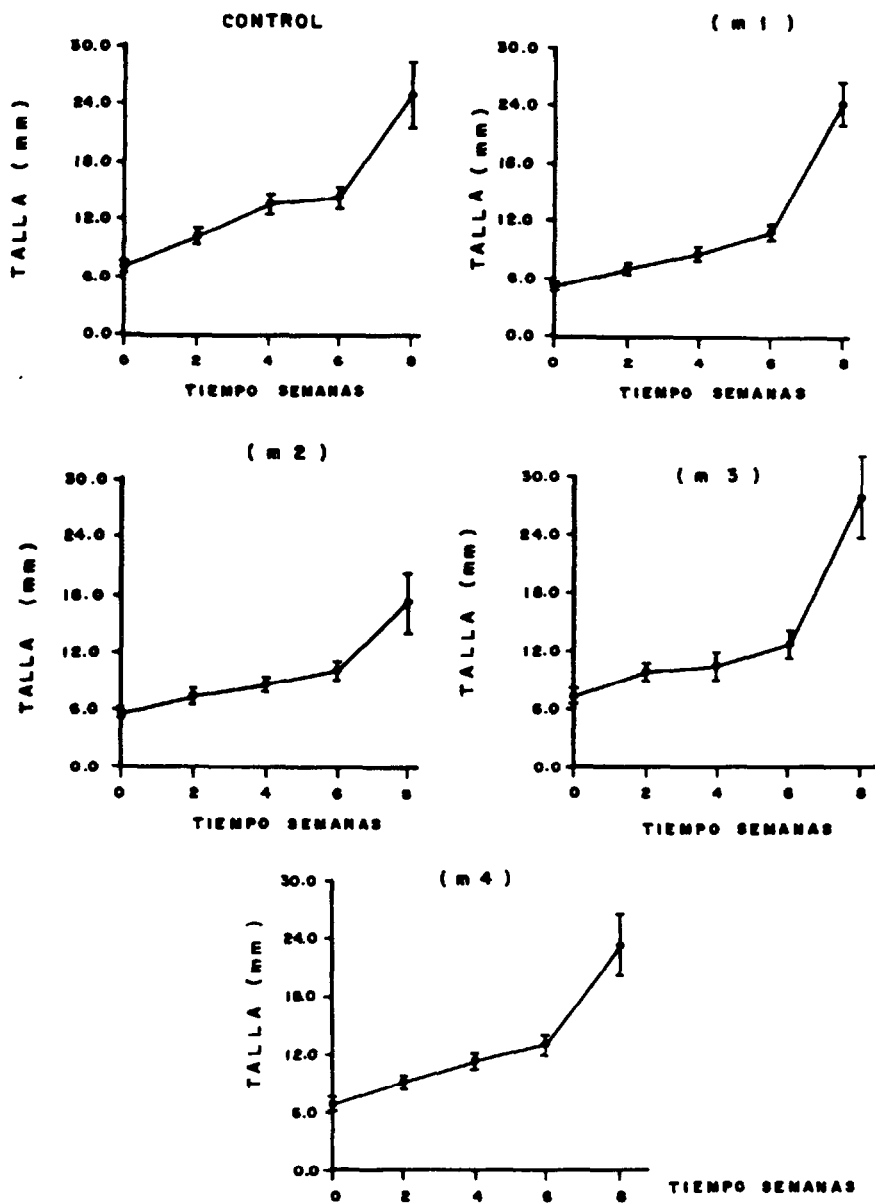


Figura 1. Curvas de crecimiento de juveniles de *G. canaliculata*. (Control) Cultivo con medio químico Von Stoch, que fue tomado como control; (M₁).- Cultivo en un medio orgánico con una concentración de 40ml del extracto del medio de vaca, aforado con agua de mar a un litro; (M₂).- 80ml aforado a un litro; (M₃).- 120ml; (M₄).- 160ml.

Figure 1. Growth curves of *G. canaliculata* juveniles. (Control) Von Stoch's chemical medium culture, taken as a control medium; (M₁).- Organic medium culture with a concentration of 40ml of cow manure extract gauged with seawater up to one liter; (M₂).- 80ml gauged to one liter; (M₃).- 120ml; (M₄).- 160ml.

carse los ejemplares y esto se adapta al modelo de la curva logística (Odum, 1977). Estas diferencias pueden deberse a que las plantas se encuentran entre la fase de inducción y la exponencial. Un análisis de varianza (ANOVA) para comparación del crecimiento por medio de las plántulas sometidas a los diferentes tratamientos, mostró que existen diferencias altamente significativas entre distintos medios. Así, al aplicar la prueba de Tukey para comparaciones múltiples se determinó que los medios orgánicos con la máxima concentración de biodigerido (M₃ y M₄) no tuvieron diferencias significativas con relación al testigo (Von Stoch) ni entre ellos mismos, pero sí resultaron ser significativamente distintos a los medios orgánicos M₁ y M₂, en los cuales la talla promedio de las plántulas experimentales resultó ser menor (Tabla II).

De las cuatro diluciones probadas, los medios M₃ y M₄ resultaron ser los más similares al control. Esto puede ser económicamente ventajoso si se toma en cuenta que con un volumen de sólo 120ml de digerido por litro (M₃) es posible obtener un crecimiento de los juveniles similar al obtenido utilizando un medio sintético.

organic media M₁ and M₂, where the average size of the experiment plantules was smaller (Table II).

Of the four tested dilutions, the media M₃ and M₄ proved to be the most similar during the control. This can be an economic advantage if we consider that with a volume of only 120ml of digested waste per liter (M₃) it is possible to obtain a juvenile growth similar to the one obtained in a synthetic medium.

The fact that we did not find differences in the growth of *G. canaliculata* between the Von Stoch and M₃ and M₄ media, despite the much lower nutrients concentration (less than 1%) of the last two in relation with the synthetic medium (Table I) may be due to what Granados and Bückle (1984) state: the growth in cultures with animal waste is partly due to the participation of organic compounds, such as aminoacids, carbohydrates, lipids and proteins, that may be used by algae as nutrient source.

The results of this work show that the organic media can be a substitute of synthetic media, at least at experimental level since the

Tabla II. Comparaciones múltiples del crecimiento promedio de *G. canaliculata* durante ocho semanas, en medio V. Stoch y medios orgánicos a diferentes concentraciones, aplicando la prueba de Tukey.

Table II. Multiple comparisons of average growth of *G. canaliculata* during eight weeks, in V. Stoch and organic media, with different concentrations, using the Tukey test.

Tratamiento	Valor observado de q	Valor de q crítico ($\alpha = 0.05$) (g.l. = 730)
V. Stoch, VS M ₁	6.44	3.86*
V. Stoch, VS M ₂	4.33	3.86
V. Stoch, VS M ₃	1.83	3.86
V. Stoch, VS M ₄	0.5	3.86
M ₄ VS M ₁	5.9	3.86**
M ₄ VS M ₂	3.83	3.86*
M ₄ VS M ₃	1.33	3.86*
M ₃ VS M ₁	4.58	3.86*
M ₃ VS M ₂	2.5	3.86*
M ₂ VS M ₁	2.08	3.86*
Prueba de Tukey =	M ₁ = M ₂ ≠ M ₃ = M ₄ = V. Stoch	

* = $\alpha = 0.05$; ** = $\alpha = 0.01$; M = Medio orgánico

El hecho de no encontrar diferencias en el crecimiento de *G. canaliculata* entre el medio Von Stoch y los M₃ y M₄, a pesar de que los dos últimos tienen mucho más bajas concentraciones de nutrientes (menos del 1%) con respecto al medio sintético (Tabla I), se puede deber a lo mencionado por Granados y Bückle (1984) en el sentido de que parte del crecimiento en cultivos con estiércoles debe ser atribuido a la participación de compuestos orgánicos que pueden ser utilizados por las algas como fuente de nutrientes.

Los resultados producto de este trabajo nos demuestran que los medios orgánicos pueden ser un sustituto de los medios sintéticos, cuando menos a nivel experimental ya que el crecimiento de *G. canaliculata* fue similar, independientemente del medio utilizado, tal como Asare (1980) al trabajar con *Gracilaria tikvahia* y *Neogardhiella baileyi* encontró que el crecimiento fue similar al utilizar medios orgánicos (extractos de oveja y conejo) y sintéticos (medio de Provasoli).

Por otro lado, es importante hacer notar que de los resultados obtenidos se deriva la posibilidad de extender investigaciones en esta línea, no sólo a estos niveles sino también a nivel producción, lo cual daría un mayor auge al cultivo de macroalgas en países subdesarrollados.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Kirke Pigmagon por su valiosa ayuda en el procesamiento de las muestras, y al dibujante Ramón Moreno por la realización de las figuras.

LITERATURA CITADA

Asare, O.S. (1980) Animal waste as Nitrogen Source for *Gracilaria tikvahiae* and *Neogardhiella baileyi* in Culture. *Aquaculture* 21:87-91.

Chávez de Ochoa, C. (1975). Algunas condiciones de surgencia durante la primavera de 1974, para el área adyacente a Punta Banda, Baja California. *Ciencias Marinas (Méx.)*. 2(2):111-124.

growth of *G. canaliculata* was similar, independantly from the used media. Thus, Asare (1980), working with *Gracilaria tikvahiae* and *Neogardhiella baileyi* found that the growth was similar whether we used organic (sheep and rabbit waste) or synthetic media (Provasoli medium).

On the other hand, it is important to note that the result of these experimental works open up the possibility of extending research in this area, not only at this level but also from the production point of view and expand the algae culture in developing countries.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Kirke Pigmagon for his valuable help in the processing of the samples and to Ramón Moreno for drawing the figures.

Katarzyna Michejda translated this paper into English.

Granados, M.C. y Bückle, L.F. (1984). Cultivo de las microalgas *Monochrysis lutheri* y *Skeletonema costatum* con nutrientes producidos por estiércoles digeridos. *An. Inst. Ciencias del Mar y Limnología, Universidad Nacional Autónoma de México*, 11(1):242-256.

Harlin, M.M., Thorne-Miller, B. and Thursby, G.B. (1979). Ammonium uptake by *Gracilaria sp.* (*Floridophyceae*) and *Ulva lactuca* (*Clorophyceae*) in closed system fish culture. *Proc. Inst. Seaweed Symp.*, 9:285-292.

Odum, E.P. (1977). *Ecología*. Nueva Editorial Interoamericana, S.A., México, 639 pp.

Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. En: Natanabe, A. and Hattori (Eds). *Cultures and Collections of Algae. Proc. U.S. Japan Cont. Hakone. Sept. 1966 Jap. Soc. P1 Physical* 63-75.

Ryan, T.A., Joiner, B.L. and Ryan, B.F. (1976). *Minitab Student Handbook*. Dextbury Press. Mass. 341 pp.

Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1979). *Biometría*. H. Blume Ediciones, Madrid, 832 pp.

Strickland, J.D.H. and Parsons, T.R. (1977). *A Practical Handbook of Seawater Analysis*. 2nd Ed. Fisheries Research Board of Canada, Bulletin, 167, Ottawa. 310 pp.

Von Stoch, H.A. (1963). Wirkung Von Jod Und Arsenit Auf Meeressalgen in Kultur. In Devirville D. and Feldmann J., eds., *Proc. Int. Seaweed Symp. 4*, 1420150 Pergamon Press, Oxford.

Zar, J.H. (1984). *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc. New Jersey, 718 pp.