

**CULTIVO DE *GRACILARIA TIKVAHIAE* (McLAHLAN)
(RHODOPHYTA, GIGARTINALES)
EN AGUAS NO PROTEGIDAS**

**OPEN-WATER CULTURE OF *GRACILARIA TIKVAHIAE*
(McLAHLAN)
(RHODOPHYTA, GIGARTINALES)**

José A. Zertuche González (*)
Cornelia G. Schlenk (**)
Boudewijn H. Brinkhuis (**).

(*) Instituto de Investigaciones Oceanológicas, UABC.
Ensenada, B.C., México.

(**) Marine Research Center, S.U.N.Y.
Stony Brook, New York, USA.

Zertuche-González José A., Schlenk Cornelia G., Brinkhuis Boudewijn H. Cultivo de *Gracilaria tikvahiae* (McLahlan) (Rhodophyta, Gigartinales) en aguas no protegidas. Open-water culture of *Gracilaria tikvahiae* (McLahlan) (Rhodophyta, Gigartinales). Ciencias Marinas; 14(1): 15-29,1988.

RESUMEN

Gracilaria tikvahiae fue cultivada sobre estructuras colocadas en aguas no protegidas frente a las costas de Long Island, N.Y. Inicialmente, *Laminaria saccharina* se cultivó con éxito sobre las estructuras en el programa de Biomasa Marina (Marine Biomass Program) de la Universidad del Estado de Nueva York. Sin embargo, su crecimiento se limitó únicamente de septiembre a junio. Con el objeto de mantener una producción durante todo el año, se seleccionó *G. tikvahiae* como una planta para ser cultivada en verano.

El presente trabajo comprende desde la obtención de esporas en el laboratorio hasta la colocación de cuerdas en mar abierto. Se utilizaron conchas de bivalvos para la fijación de esporas. Se probó también la siembra de juveniles insertándolos manualmente en cuerdas de polivinil-alcohol. Cuando las plantas alcanzaron 3 cm de longitud, aproximadamente, se colocaron en cuerdas de polietileno y se llevaron al mar. Estas cuerdas fueron colgadas de una estructura flotante a 1.5 Km de la costa en una área expuesta con condiciones de mar abierto.

Las concentraciones de nutrientes en el campo no fueron suficientes para mantener el crecimiento de *G. tikvahiae* en esta época del año. Al bajar los cultivos a mayor profundidad resultó en un recuperación de los cultivos ya que se redujo la intensidad de luz y así la demanda de nutrientes para el crecimiento. Sin embargo, con un bajo crecimiento los cultivos no pudieron sobreponerse a una intensa colonización de epífitas y epizoos. El cultivo de *G. tikvahiae* en estas aguas requiere de fertilización artificial.

ABSTRACT

Gracilaria tikvahiae was cultured on an experimental seaweed farm off the Long Island, New York coast under open water conditions. Initially, *Laminaria saccharina* was cultured successfully on this artificial substratum in the Marine Biomass Program of the State University of New York. This species, however, only grew from September to June. *Gracilaria tikvahiae* was selected to be cultured in the summer months to maintain production throughout the year.

The present work ranges from the isolation of the spores in the laboratory to the deployment of culture ropes in open water. Bivalve shells were used as substratum for the spores. Seeding of juveniles manually inserted in polyvinyl alcohol strings was also tried. When the plants reached 3 cm lengths, the shells and strings were fastened to culture ropes and deployed in the sea. These ropes were hung from floating farm, 1.5 Km off shore, under open-water conditions.

Nutrient concentrations at the field site were not sufficient to maintain a high growth rate of *Gracilaria tikvahiae* during summer. Lowering the cultures to deeper water resulted in a recovery of the cultures since light was reduced and, thus, nutrient demand for growth. With a low growth rate, however, the plants were unable to overcome severe fouling by epiphytes and epizoa. The culture *G. tikvahiae* in these waters requires artificial fertilization.

INTRODUCCION

Los cultivos de algas en el mar están limitados a zonas someras y protegidas donde las artes de cultivo reciben suficiente luz para soportar crecimiento y un movimiento de agua reducido para minimizar daños. Conforme el maricultivo de algas se va incrementando, será necesario expandirse a zonas más profundas y más expuestas. En algunos países la zona costera protegida y somera es muy pequeña. En otros está restringida o reservada a actividades tales como: el turismo, el cabotaje o la pesca. Por tal motivo se ha visto la necesidad de implementar cultivos en zonas más alejadas de la costa (Brinkhuis *et al.*, 1983a).

Con la idea de estudiar la posibilidad de expandir los cultivos de algas a zonas expuestas y de mayor profundidad, el programa de Biomasa Marina de la Universidad del Estado de Nueva York (Marine Biomass Program) inició el cultivo de *Laminaria saccharina* sobre substratos artificiales colocados en aguas no protegidas. Las plantas sujetas a cuerdas de polipropileno se mantenían entre tres y cinco metros de profundidad pendientes de una estructura flotante anclada en el fondo. El objetivo final de este proyecto (MBP) era obtener metano como fuente de energía a partir de las algas marinas (Brinkhuis y Hanisak, 1982; Brinkhuis *et al.*, 1983a, 1983b, 1984).

Aunque *L. saccharina* se cultivó con éxito su crecimiento se limitó de septiembre a junio. Prefiere aguas frías y no soporta temperaturas arriba de los 18 °C por mucho tiempo (Brinkhuis *et al.*, 1983a, 1983b, 1984). Con el fin de obtener una producción durante todo el año, se consideró necesario seleccionar

INTRODUCTION

Mariculture of red seaweeds is often limited to shallow and enclosed bays where culture rafts are exposed to sufficient light to support growth and reduced water motion to minimize damage. As seaweed culture expands, it will be necessary to expand the culturing area to deeper and more exposed waters. In some countries, the protected and shallow coastal zone is too small and in others it is restricted or reserved for activities such as recreation, boating or fishing. For these reasons, it has become necessary to implement seaweed culture in offshore waters (Brinkhuis *et al.*, 1983a).

With the aim to study the possibility of extending seaweed mariculture to open waters, the Marine Biomass Program of the State University of New York initiated a study to culture *Laminaria saccharina* on artificial substrata located in open waters. Plants tied on polypropylene rope were kept from 3 to 5 m deep held from a floating structure anchored at the bottom. The final objective of that project (MBP) was to determine the feasibility of a seaweed to methane alternative energy source (Brinkhuis and Hanisak, 1982; Brinkhuis *et al.* 1983a, 1983b, 1984).

Although *L. saccharina* was cultured successfully, its growth was limited to the period from September to June. This species prefers cold waters and it can not withstand water temperatures in excess of 18 °C for very long (Brinkhuis *et al.*, 1983a, 1983b, 1984). With the objective to obtain production throughout the year, we considered it necessary to select a species whose maximum growth would be during the summer - the

alguna especie cuyo máximo crecimiento fuera durante el verano -época en que se cosecha *Laminaria* -. Se escogió *Gracilaria tikvahiae* porque se encuentra en abundancia durante esta época, además de que también puede utilizarse como fuente de agar.

En los últimos diez años, varias especies del género *Gracilaria* sp. han sido estudiadas extensivamente por su potencial como fuente de agar. Esta rodofita se ha cultivado con éxito en tanques de cultivo (Edelstein *et al.*, 1976, Edelstein 1977), pozas artificiales (Shang 1976) y bahías protegidas (Li *et al.*, 1984, Ren *et al.*, 1984). Este interés se ha extendido ahora por el cultivo de *Gracilaria* sp como fuente de biomasa para la obtención de metano (Hanisak 1981a, 1981b, Hanisak & Ryther 1983).

En el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos en el cultivo de *Gracilaria tikvahiae* en aguas no protegidas utilizando substratos artificiales. Este incluye estudios en tanques de cultivo para conocer el crecimiento de esta especie bajo condiciones naturales de luz y nutrientes que nos sirvieron de base para su cultivo en el mar.

MATERIALES Y METODOS

I. Obtención y preparación de cultivos

Ramificaciones tetrasporofitas de *Gracilaria tikvahiae* en estado reproductivo se colocaron sobre conchas de ostión y mejillón siguiendo las indicaciones sugeridas por Gallagher y Humm (1983) para el cultivo de esta especie. A las 48 horas, hubo una fuerte liberación de esporas que rápidamente se adherieron a las conchas. Las conchas sembradas se mantuvieron inmersas en un medio de cultivo enriquecido Provasoli (Bold & Wynne 1978) dentro de un incubador a una temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$, y un fotoperíodo de 12:12. La intensidad de la luz, obtenida de lámparas fluorescentes "Cool White", fue de $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{sec}^{-1}$. Después de dos semanas, los cultivos comenzaron a ser aireados mediante bombas de acuario. La densidad excesiva de las plantas sobre las conchas fue controlada raspando individuos con un bisturí. Las plantas así liberadas, y aquellas que se

time of the year when *L. saccharina* is harvested. For this purpose, we selected *Gracilaria tikvahiae* because it is abundant during this season and it can be used as source of agar.

In the last ten years, several species of *Gracilaria* have been studied extensively due to its potential as a source of agar. This rhodophyte has been cultured successfully in tanks (Edelstein *et al.*, 1976; Edelstein, 1977), artificial ponds (Shang, 1976) and protected bays (Li *et al.*, 1984; Ren *et al.*, 1984). This interest has now extended to the culture of *Gracilaria* sp. as a source of biomass for methane conversion (Hanisak, 1981a, 1981b; Hanisak and Ryther 1983).

In this study, we present the results obtained in the culture of *Gracilaria tikvahiae* in open waters using artificial substrata. It includes tank culture studies to know the growth of this species under natural conditions of light and nutrients that could be used as a base for its culture at sea.

MATERIALS AND METHODS

I. Obtaining and preparation of cultures

Reproductive tetrasporophyte branches of *Gracilaria tikvahiae* were placed on oyster and mussel shells following the indications suggested by Gallagher and Humm (1983) for the culturing of the species. After 48 hrs, there was a strong release of spores that quickly attached to the shells. The seeded shells were kept immersed in enriched Provasoli culture media (Bold and Wynne, 1978) in an incubator at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, and 12:12 dark:light photoperiod. The irradiance, obtained from "cool-white" fluorescent lamp, was $100 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$. After two weeks, the cultures were provided with aeration using aquarium pumps. The excessive density of plants on the shells was controlled by scraping individuals off with a scalpel. Plants thus liberated and those that came loose by themselves were retained to be used later for manual seeding of culture strings.

When the ambient temperature reached 19°C , the cultures were moved to a greenhouse next to the laboratory supplied with

desprendían por sí solas, fueron retenidas para ser utilizadas posteriormente en el sembrado manual de cuerdas.

Cuando la temperatura ambiental alcanzó los 19°C, las plantas fueron trasladadas a unos tanques de cultivo dentro de un invernadero anexo al laboratorio abastecidos con agua de mar en forma continua. Se utilizaron tres tanques de polietileno de aproximadamente 80 cm de alto, por 30 cm de ancho y 100 cm de largo. El agua dentro de los tanques se mantenía en constante agitación inyectando aire comprimido desde el fondo del tanque.

Las conchas fueron insertadas a unas cuerdas chinas de polivinil de aproximadamente 3 mm de diámetro. Estas cuerdas fueron seleccionadas después de probar con materiales sintéticos de diferentes países; tres de origen oriental (China, Japón y Corea) de polivinil alcohol y una de Estados Unidos de polipropileno. La cuerda china ofreció un mejor sustrato para la fijación de las esporas sin deformarse al exponerse al agua.

Se colocaron cinco conchas por cuerda, fijadas con nudos que las separan 20 cm una de la otra. Las cuerdas con conchas fueron sometidas bajo 20 cm de agua dentro de un tanque de cultivo con fuerte aireación. Las plantas sueltas se mantuvieron en un tanque en constante agitación para posteriormente ser insertadas en cuerdas.

Las plantas sueltas fueron sembradas al polivinil chino insertándolas manualmente a través de las hebras de la cuerda. Esta cuerda tiene una rigidez ideal para que, al destorcerse, forme un espacio adecuado para insertar la planta y en cuanto se suelta, regrese a su posición original sujetando el talo sin dañarlo. De esta manera se sembraron 50 cuerdas de aproximadamente 70 cm de longitud con plantas de tres a cinco cm. El número de plantas por cuerda varió de 17 a 43 dependiendo del tamaño de las plantas. Estas cuerdas también fueron mantenidas dentro de un tanque de cultivo con fuerte aireación de la misma manera que las cuerdas con conchas.

flowthrough seawater. Three tanks approximately 80 cm high, 30 wide and 100 long were used. The water in the tanks was kept in constant movement with strong aeration supplied from the bottom of the tank.

The shells were threaded onto polyvinyl chinese culture strings of approximately 3 mm of diameter. These strings were selected after testing with four synthetic materials for seeding strings: Chinese, Korean, Japanese, and U.S.A. The first three were polyvinyl alcohol materials while the U.S.A. was polypropylene material. The Chinese string was the best because it provided good substrat for attachment of spores and held together well when subjected to seawater.

Five shells per string were spaced 20 cm apart. These shell-string cultures were under 20 cm of water inside the tank provided with strong aeration. The remaining loose plants were placed in tumbling culture tanks to be later seeded onto strings.

The loose plants were seeded onto the Chinese string by manually inserting them through the threads of the string. This polyvinyl string has an ideal rigidity so when it is untwisted, it forms an adequate space to insert the plant; when let loose, it returns to its original form holding the thallus without harming it. Fifty strings of approximately 70 cm long were seeded in this way with plants 3 to 5 cm long. The number of plants per string varied from 17 to 43 depending on the size of the plants. These strings were also kept inside a culture tank with strong aeration like the strings with shells.

II. Light Experiment

To know the growth of *G. tikvahiae* under natural light conditions so we could determine the depth at which the culture should be installed, plants were grown at different depths within a tank. The plants were weighed (wet weight) weekly during three weeks in June. Groups of six plants were attached to strings held at eight different depths by a PVC rack. The plants were held at depths of 5 to 70 cm in increments of 10 cm (from 0.9 to 0.25 ambient irradiance on the tank surface). Maximum irradiance at each

II. Experimentos de luz

Para conocer el crecimiento de *Gracilaria tikvahiae* bajo condiciones naturales de luz de manera que pudieramos determinar la profundidad a la que se debían instalarse nuestros cultivos en el campo, se midió el crecimiento de plantas que se cultivaron a varias profundidades dentro de un tanque. Las plantas se pesaron (peso húmedo) semanalmente por un período de tres semanas durante el mes de junio. Se colocaron grupos de seis plantas en cuerda polivinil china a ocho profundidades dentro del tanque utilizando un armazón de tubo de cloro-polivinil (PVC). Las plantas se mantuvieron entre 5 y 70 cm. de profundidad en incrementos de 10 cm (de 0.9 a 0.25 de la irradiación ambiental sobre la superficie del tanque). Se midió la intensidad máxima de la luz dentro de los tanques en un día claro y despejado, y con el sol en su máxima altura utilizando un radiómetro portátil LICOR LI=185 con sensor sumergible.

Las plantas fueron pesadas en una balanza analítica Sartorius M2024 con tara automática y precisión de 0.02 mg. Para ello, se removió el exceso de agua de la planta utilizando una toalla de papel (KIMPWIPES) antes de pesarse.

El crecimiento fue medido como incrementos en peso húmedo y calculado en porcentaje de crecimiento por día usando la fórmula (Penniman 1983):

$$G = [(W_t/W_0) - 1/t - 1] 100$$

donde: G = Porcentaje del incremento en peso fresco por día, W_0 = Peso inicial, W_t = Peso después de t días, y t = Tiempo en días.

Las diferencias en crecimiento fueron probadas mediante una prueba Tukey - Kramer (Sokal y Rohlf, 1981) para comparación múltiple de promedios después de comprobar la distribución normal y homogeneidad de varianzas mediante las pruebas de Kolgomorov-Smirnof y Scheffe - Box, respectivamente (Sokal y Rohlf, 1981).

III. Cultivos de campo

substratum depth was measured inside a tank on a clear and sunny day with a portable LICOR LI-185 lightmeter with submersible probe.

Plants were weighed using an Sartorius M2024 analytical balance with automatic tare and a precision of 0.02 mg. The excess water was blotted using paper towels (KIMP-WIPES).

Growth was measured as increments of wet weight given as % growth per day using the formula of Penniman (1983):

$$G = [(W_t/W_0) - 1/t - 1] 100$$

where G = Percent growth per day, W_0 = Initial weight, W_t = Weight after t days, and t = Time in days.

Differences in growth were tested using a Tukey-Kramer test for multiple comparisons of means (Sokal and Rohlf, 1981), after verifying normality and homogeneity of variances using the Kolgomorov-Smirnof and Scheffe-Box respectively (Sokal and Rohlf, 1981).

III. Field Cultures

a) *Gracilaria* on ropes and shells

After growing in the greenhouse for six weeks, the cultures were prepared for deployment at the open-water site. To make them more sturdy and better able to withstand field conditions, the strings seeded with loose plants were attached to 2 m and 3 m long (16 mm diameter), three-strand, polypropylene ropes. Three strings were attached to each 2 m rope and the four strings attached to each 3 m rope.

No satisfactory method could be devised for attaching the shell-string cultures to the sturdier ropes without plant abrasion, so these strings were hung freely in sets of 2 or 3 string end-to-end with shackles. Plants were growing on both sides of the shells.

b) Field sites and frames

a.) *Gracilaria* en cuerdas y conchas:

Después de crecer durante seis semanas en tanques de cultivo dentro del invernadero, los cultivos fueron preparados para su colocación en el mar. Para hacer los cultivos más fuertes y resistentes a las condiciones del campo, las cuerdas sembradas con plantas individuales (polivinil chino) fueron enrolladas a cuerdas más gruesas de polipropileno (16 mm de diámetro) de dos y tres metros de longitud. A cada una de las cuerdas gruesas de dos y tres metros, se les amarraron tres y cuatro cuerdas de polivinil chino, respectivamente.

No se pudo implementar un diseño satisfactorio para adherir las cuerdas de cultivo con conchas a cuerdas más resistentes de polipropileno sin dañar a las plantas. Por lo tanto, estas cuerdas con concha se dejaron colgar libremente en grupos de dos y tres, unidas en sus extremos por medio de grilletes. Las plantas crecieron en ambos lados de la concha.

b.) Areas de estudio y estructuras:

Dos estructuras artificiales fueron colocadas en dos lugares frente a la costa norte de Long Island para el cultivo de *G. tikvahiae* en aguas no protegidas (Fig. 1). El primer sitio se localizó en un lugar somero (3 m de profundidad con respecto al nivel de Bajamar Medio) aunque expuesto a condiciones de mar abierto frente a Crane Neck Point, Long Island, N.Y. Las cuerdas de cultivo fueron colgadas verticalmente en la columna de agua utilizando un armazón de acero anclado en el fondo. Este armazón consistió de dos barrotes verticales con un cable suspendido entre ellos a manera de tendadero.

El segundo sitio estuvo localizado a 1.5 Km de la costa y 23 m de profundidad. Debido a las pobres condiciones de luz que existían en el fondo, fue necesario utilizar una estructura flotante que mantuviera las cuerdas de cultivo a profundidades con luz suficiente para mantener crecimiento (entre tres y cinco metros). Esta estructura consistió de un rectángulo de cables de acero de 35.5 m x 12.5 m, anclado en el fondo y suspendido horizontalmente por medio de boyas en cada vértice (fig. 2). Ambos sitios y estructuras han sido utiliza-

Two artificial substrata were deployed at two sites off the north shore of Long Island for *G. tikvahiae* culturing in open waters (Fig.1). The first site was located at a shallow but exposed site (3m M.L.W.) off Crane Neck Point, Long Island, N.Y. The culture ropes were hung vertically in the column water attached to a steel frame anchors at the bottom. This frame consisted of twin vertical beams with a long line suspended between the beams.

The second site was located 1.5 Km off the coast near Crane Neck in waters 23 m deep. Due to the poor conditions of light at the this site, it was necessary to use a floating structure that would keep the cultures at a depth with enough light to maintain growth (between three and five meters deep). This structure consisted of an anchored 35.5 x 12.5 m horizontal floating grid suspended by buoys (fig.2). Both sites and structures have been previously described and used for the cultivation of the brown kelp *Laminaria saccharina* (Brinkhuis *et al.*,1982). Brinkhuis and his co-workers, who designed and built these structures have referred to them as the ZEST located in shallow water, and as the BEEF anchored off the coast (see Brinkhuis *et al* 1983a). For convenience in this study, we will refer to them in the same way.

c) Deep station (BEEF)

Seventeen culture ropes (fourteen with *Gracilaria* on Chinese strings and three with *Gracilaria* on shells) were prepared for deployment at the BEEF. The positions of the ropes were deployed on 12 July 1984. The ropes were hung vertically from horizontal cables held by buoys so that the shallowest plants were 1.5 m from the surface. All seed-string culture ropes and shell-strings were weighted at the bottom to hang vertically with the deepest plants at 4.5 m.

On July 20, following our first observations of the offshore BEEF cultures, 1.2 m extensions were added to all three of the shell-string culture lines and to 9 of the 14 seed-string lines. The five 3 m lines did not receive the extensions. The shallowest and deepest plants at the offshore site were then at 2.0 and 5.5 m, respectively.

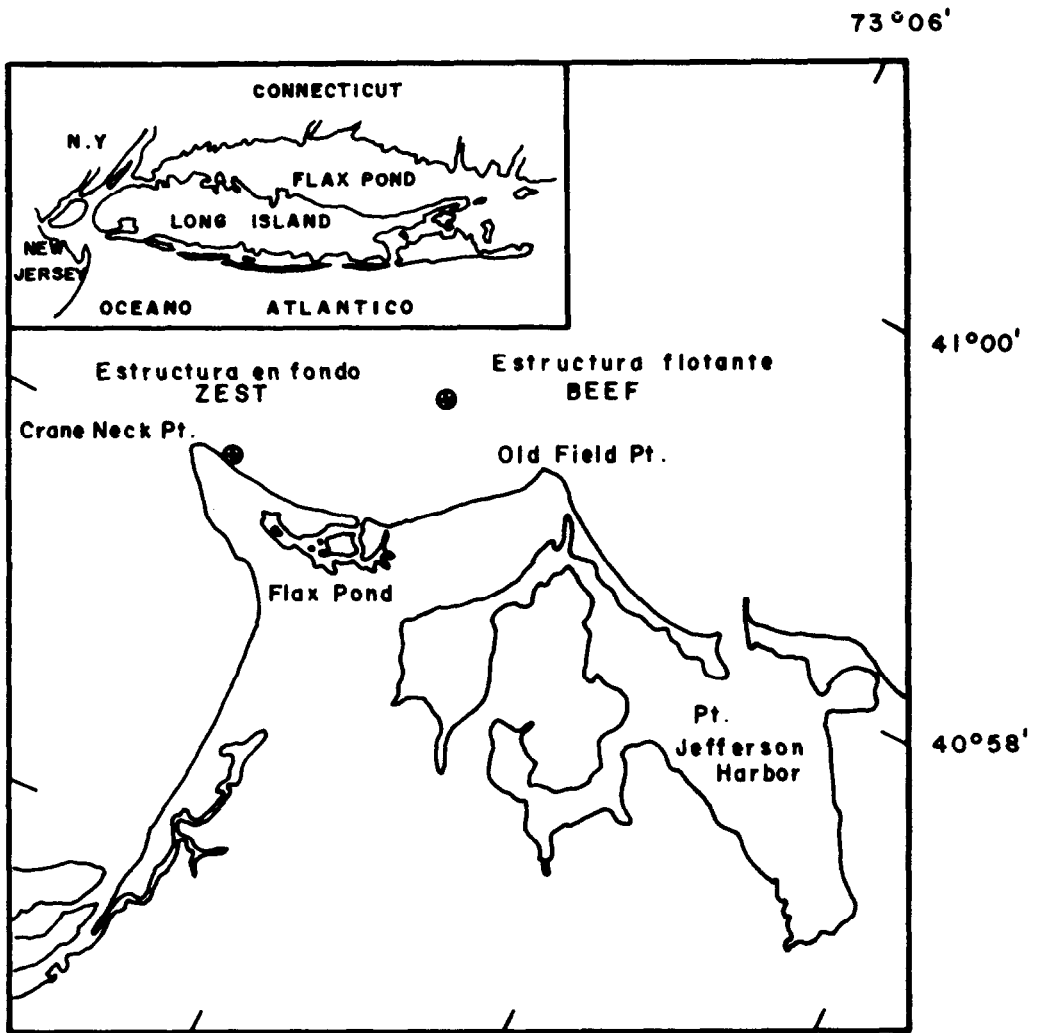


Figura 1. Mapa de localización de estructuras para cultivo en aguas no protegidas.
Figure 1. Localization map of the structures for culture in exposed waters.

dos y descritos con anterioridad para el cultivo de *Laminaria saccharina* (Brinkhuis et al., 1982). Brinkhuis y sus colaboradores, quienes diseñaron y construyeron estas estructuras, se han referido a ellas (ver Brinkhuis et al. 1983a) como ZEST a la estructura en aguas someras; y BEEF a la estructura flotante en aguas profundas. Por comodidad, en este escrito nos referiremos a ellas de la misma manera.

d) Shallow station (ZEST)

G. tikvahiae rope cultures were deployed at the shallow site (off Crane Neck Point) on 16 July, 1984. Three polypropylene culture ropes, 1.5 m long and 13 mm diameter, with two Chinese seed strings each hung from the ZEST. Each Chinese string held from 17 to 26 plants, depending on their size. The total number of plants at the ZEST was 124.

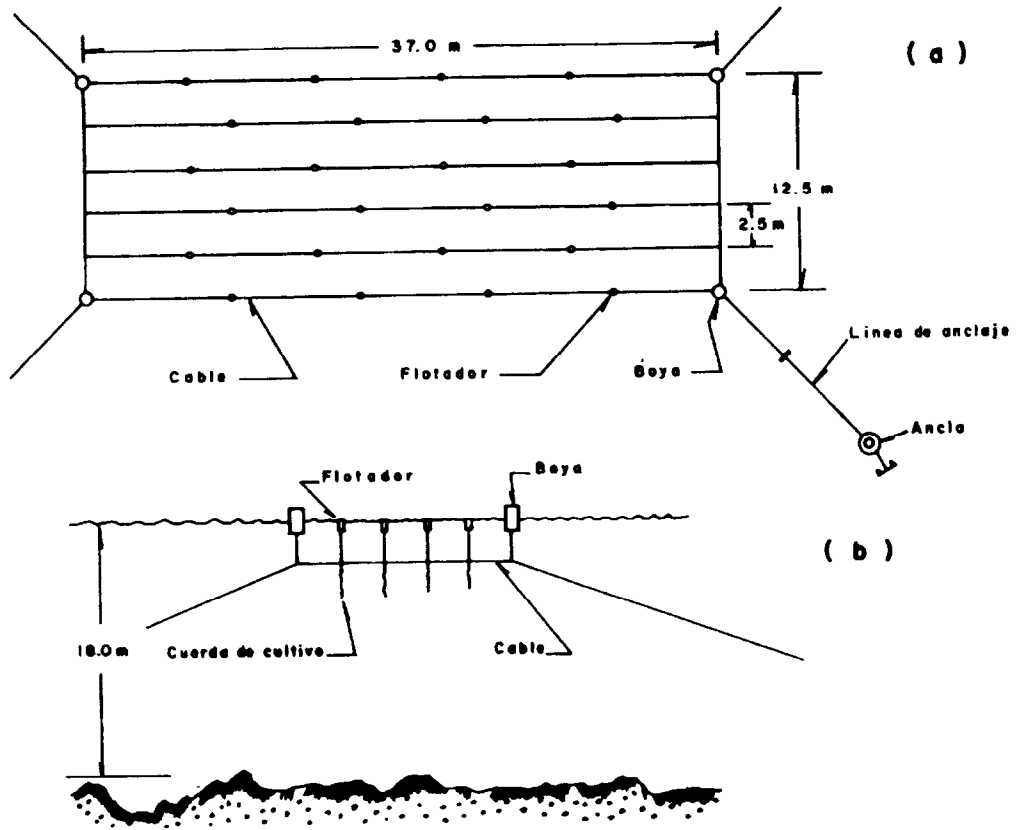


Figure 2. Estructura flotante BEEF a) vista aérea, b) vista lateral.
 Figure 2. Floating structure BEEF a) aerial view, b) lateral view.

c) Estación profunda (BEEF):

Un total de diecisiete cuerdas de cultivo (catorce con *G. tikvahiae* entrelazada en polivinil chino y tres con *G. tikvahiae* en conchas) fueron preparadas para su instalación en la estación BEEF. Las posiciones de las cuerdas de polipropileno sobre la estructura fueron escogidas por su accesibilidad y protección. Todas las cuerdas fueron colocadas en este lugar el 12 de julio de 1984. Estas fueron colgadas verticalmente sobre los cables horizontales sostenidos por boyas, de manera que las plantas más someras se encontraban a una profundidad de 1.5 m. Se colocó un peso al final de todas las cuerdas para mantenerlas en posición vertical con las plantas más profundas a 4.5 m.

These plants belong to the same group of plants used for the BEEF station, so no phenotype or genotype differences were present between sites. The growth and condition of the plants was continuously observed during the summer.

e) *In situ* fertilization

To test the effects of *in situ* fertilization on culture growth and condition, permeable tubes containing fertilizer were constructed. Plastic screen of 1 cm mesh size was used to make six 50 x 3 cm cylinders. A 1 mm mesh plastic screen bag containing 470±10 g of agricultural fertilizer (OSMOCOTE) was inserted inside each cylinder. Osmocote is a time-release fertilizer supplying nitrate, am-

El 20 de julio, siguiendo nuestras primeras observaciones de cultivo en la estación profunda (BEEF), se pusieron extensiones de 1.2 m a todas las cuerdas de cultivo con conchas y a nueve de las catorce cuerdas con plantas individuales. A las cinco cuerdas de tres metros de longitud no se les puso extensiones. De esta manera las plantas más profundas y las más someras en la estación BEEF estuvieron a 2.0 y 5.5 m de profundidad, respectivamente.

d) Estación somera (ZEST) :

Los cultivos de *G. tikvahiae* fueron colocados en el lugar cercano a la costa (frente a Crane Neck) el 16 de julio de 1984. Tres cuerdas de polipropileno de 1.5 m de largo y 13 mm de diámetro con dos cuerdas de polivinil chino cada una, fueron colgadas del ZEST. En cada cuerda china se insertaron de 17 a 26 plantas dependiendo de su tamaño. El total de plantas en el ZEST fue de 124. Estas plantas pertenecieron al mismo grupo de plantas generadas para la estación profunda (BEEF) de manera que no hubiera diferencias genotípicas ni fenotípicas entre las plantas de una estación y la otra. El crecimiento y condición de las plantas se continuó revisando regularmente en ambas estaciones durante verano.

e) Fertilización *in situ*

Para probar los efectos de la fertilización *in situ* en el crecimiento y condición de los cultivos, se construyeron unos tubos permeables que contuvieron fertilizante. Se utilizó una malla de plástico con luz de 1 cm para hacer seis cilindros de 50 cm de largo por 3 cm de diámetro. Una bolsa de malla de 1 mm de luz con 470± 10 g de fertilizante agrícola (OSMOCOTE) fue colocada dentro de cada cilindro. OSMOCOTE es un fertilizante que abastece de nitratos, amonio y fosfato a los cultivos conforme se va disolviendo en el tiempo. Este fertilizante ha sido utilizado con anterioridad para la fertilización *in situ* de *Laminaria saccharina* en este mismo lugar y en *Macrocystis pyrifera* en aguas de California (Gerard, comunicación personal). Una cuerda de polivinil chino sembrada con *Gracilaria tikvahiae* fue enrollada alrededor de cada cilindro. Tres cilindros fueron amarrados jun-

monium, and phosphate, and has been previously used for *in situ* fertilization of *Laminaria saccharina* at this site and *Macrocystis pyrifera* in California waters (Gerard, personal communication). A seed string of inserted *Gracilaria tikvahiae* plants was wrapped around each cylinder. Three cylinders were strung together and two such cylinder-lines were deployed at the offshore BEEF site on 23 July (ten days after the deployment of the culture ropes).

RESULTS

I. Laboratory cultures

Seeding of spores on the shells was very successful. The spores showed strong attachment and vigorous growth while in the incubator. There was no difference in attachment on oyster or mussel shells nor the inside or out side of the shells.

When the plants were moved to the greenhouse tanks, they grew much faster. However, it was necessary to clean the cultures at least twice a week to keep the plants free of epiphytes and sediment. Although some plants fell off the shells, new recruits with stronger attachment were seen. Overall, the plants growing on the shells looked better than those inserted in the culture strings.

II. Light Experiment in Tanks

There was a clear gradient of higher to lower growth from surface to bottom of the culture tank. Maximum growth of 12.3 % and 11.1 % d⁻¹ was observed in plants cultured at fixed positions of 5 and 15cm depth (I=I₀ 0.9 and 0.7, respectively)(table I).

The growth data showed a normal distribution (Kolmogorov-Smirnov) and homogeneity of variances (Scheffe-Box). A multiple comparison of means test by the Tukey-Kramer method (Sokal and Rohlf, 1981) showed that the plants cultured at a depth equal to or greater than 25 cm (I=I₀ 0.6), was significantly less (p=0.05) than that of plants closer to the surface (I=I₀ 0.9 and I=I₀ 0.7). Although there was a clear tenden-

Tabla I. *Gracilaria tikvahiae* mantenida durante tres semanas en un tanque de cultivo (del 4 al 25 de junio). $I_0 = 451 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, máxima intensidad de luz medida el 25 de junio. La última columna corresponde a plantas que circulan libremente entre el fondo y la superficie del tanque.

Table I. *Gracilaria tikvahiae* kept in a culture tank during three weeks (from June 4 to 25). $I_0 = 451 \mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$, maximum light intensity measured on June 25. The last column corresponds to plants that circulate freely between the bottom and the surface of the tank.

Prof.(cm) del tanque	dentro	5	15	25	35	45	55	65	70	0-70
% I_0		90	74	60	50	40	33	27	25	
$x = \% / d$ crecimiento		12.4	11.1	5.3	4.0	3.9	2.9	1.9	2.1	5.0
$n_i =$ número de plantas		6	5	5	6	5	5	6	13	18
S_i^2		5.1538	14.1080	3.2544	1.7161	1.6154	0.1980	0.6269	1.3870	5.4429

tos para formar una cuerda de cultivo, y dos cuerdas como esta fueron colocadas en el BEEF el 23 de julio (diez días después de que se inició el cultivo extensivo).

RESULTADOS

I. Obtención y preparación de los cultivos:

La siembra de esporas sobre conchas de molusco tuvo mucho éxito. Las esporas mostraron una fuerte adhesión y apariencia sana mientras crecieron en el incubador. No hubo diferencias en fijación en cuanto al uso de conchas de mejillón o de ostión; ni la superficie interna o externa de la concha.

Cuando las plantas fueron trasladadas a los tanques de cultivo dentro del invernadero, crecieron mucho más rápido. Sin embargo fue necesario limpiar los cultivos dos veces por semana para mantenerlas libres de epifitas y sedimentos. Aunque algunas plantas se soltaron de las conchas, se vieron nuevos juveniles fuertemente adheridos. En general, las plantas que crecieron sobre las conchas se vieron mejor que las plantas insertadas entre las cuerdas.

cy of growth to decrease with depth, the growth of plants cultured between 25 cm and the bottom was not statistically different.

Although the plants cultured close to the surface (5 and 15 cm) grew at least twice as fast as the plants cultured at 25 cm, the showed a pale coloration by the end of the experiment as if they were nutrient limited. The plants that grew at approximately 5 % per day or less did not become pale.

III. Field Cultures

A response similar to that of the surface plants used in the light experiment was observed in the cultures deployed at the offshore BEEF site. Initially the plants grew fast. However, the shallowest plants bleached even more quickly in the field than in the green house tank. Plants at the bottoms of the strings were still a healthy red color, whereas shallower plants were bleached to pink, green and even white nearest the surface.

Within three days of increasing the depth of many of the culture lines, recovery in most of the plants was observed. Bleaching of the thalli was not observed in the fertilized cultures or the plants deployed at the nearshore ZEST site.

II. Experimento de luz en tanques

Se observó un marcado gradiente de mayor a menor crecimiento, de la superficie al fondo del tanque. El máximo crecimiento de 12.3 % y 11.1 % por día, se observó en las plantas en una posición fija a 5 y 15 cm de profundidad ($I=I_0 0.9$ y 0.7 respectivamente) (tabla 1).

Los resultados de crecimiento mostraron una distribución normal (Kolmogorov - Smirnov) y homogeneidad de varianza (Scheffe - Box). Una comparación múltiple de promedios por el método Tukey - Kramer (Sokal & Rohlf, 1981) mostró que el crecimiento de las plantas cultivadas a una profundidad mayor o igual a 25 cm ($I=I_0 0.6$) fue significativamente menor ($p=0.05$) que las plantas que crecieron cerca de la superficie ($I= I_0 0.9$ y $I = I_0 0.7$). Aunque existe una clara tendencia de crecimiento a disminuir con la profundidad. Las diferencias en el crecimiento de las plantas fijas entre los 25 cm y el fondo no fue estadísticamente significativa.

Aunque las plantas cerca de la superficie (5 y 15 cm) mostraron un crecimiento cuando menos de dos veces mayor que las plantas a 25 cm, estas mostraron una coloración pálida al final del experimento como si estuvieran limitadas por nutrientes. Las plantas que crecieron aproximadamente 5 % por día o menos no perdieron coloración.

III. Cultivos en el campo

Una respuesta similar a la observada a las plantas de la superficie en el experimento de la luz fue observada en los cultivos colocados en la estación alejada de la costa (BEEF). Inicialmente las plantas crecieron rápidamente. Sin embargo, las plantas más someras se decoloraron aún más rápido que las plantas de los tanques que estaban cerca de la superficie. Las plantas del fondo de las cuerdas mantuvieron una coloración roja típica de una planta saludable, mientras que las plantas más someras mostraron un color rosado, verde y aún blanco en las partes más cercanas a la superficie. A los tres días de haber incrementado la profundidad de las cuerdas de cultivo, se observó un recuperación en la mayoría

Most plants were lost from the seed-string cultures at the BEEF after only 4 weeks in the field. Many, but fewer, plants also were lost from the nearshore ZEST cultures. In contrast, the plants attached to the shells remained very dense. The plants that did survive looked healthy and nearly all had developed female reproductive structures.

Epiphytes and colonizing fauna soon appeared on the culture lines. By the eighth week, all lines of the offshore cultures were heavily fouled with filamentous red algae, tube-building amphipods, caprellids, mussels, barnacles, and tunicates. Yet, the remaining plants continued to look healthy, even when partially coated by the amphipods mud-tubes. A modest growth was noticed. Plants on the shell-strings, also partially covered with mud-tubes, reached up to 15 cm in length. Similar fouling was observed at the nearshore site, but to a lesser extent.

All culture ropes were removed from the field sites by the fourteenth week. All shell cultures had been lost because the strings that supported them did not stand the weight. Most of the few surviving seed-string plants were hardly discernible beneath the mats of mud-tubes and mussels byssal threads. All remaining plants were reproductive females. Although very few more branched and flat thallus than their parents were observed on the plastic mesh cylinders.

DISCUSSION

Gracilaria tikvahiae typically grows within semi-enclosed systems with sand or muddy bottoms (Bird *et al.*, 1977; Mathieson *et al.*, 1981; Penniman, 1984) where there is a strong nutrient recycling (Valiela, 1983). At the same time, *G. tikvahiae* has been characterized by its strong ability to take up dissolved nutrients (Penniman, 1983) and its preference for ammonium over nitrate and nitrite. In their culture studies which *G. tikvahiae* in tanks, Lapointe and Ryther (1978) reported growth up to 60 % per day for fertilized vegetative plants.

de las plantas. La decoloración del talo no se observó en los cultivos fertilizados o en las plantas colocadas en la estación cercana a la costa (ZEST).

La mayoría de las plantas insertadas en las cuerdas de cultivo se perdieron después de cuatro semanas en el BEEF. También se perdió la mayoría de las plantas en el ZEST aunque en menor cantidad. En contraste, las plantas adheridas a las conchas se mantuvieron en buen estado. Las plantas que sobrevivieron se observaron sanas prácticamente todas desarrollaron estructuras reproductivas femeninas (cystocarpos).

Al poco tiempo de instalarse los cultivos en el campo, aparecieron epiflora y epifauna en gran abundancia. Para la octava semana, todas las cuerdas de la estación alejada a la costa (BEEF) se cubrieron severamente con algas rojas filamentosas, anfípodos tubícolas, caprélidos, mejillones, percebes y tunicados. Todavía así, las plantas restantes continuaron viéndose sanas y se notó un modesto crecimiento a pesar de que estuvieron parcialmente cubiertas por tubos fabricados por anfípodos. Las plantas sobre conchas, también parcialmente cubiertas con tubos de lodo, alcanzaron hasta 15 cm de longitud. Una cobertura similar se observó en el lugar cercano a la costa pero no tan intensa.

Todas las cuerdas de cultivo fueron retiradas después de catorce semanas. Todos los cultivos de conchas se habían perdido para entonces debido a que las cuerdas que las sostenían no soportaron el peso. La mayoría de las plantas sobrevivientes sobre las cuerdas de cultivo difícilmente se distinguían debajo de los tubos de lodo de los brizoarios y filamentos bisales de mejillones. Todas las plantas remanentes fueron femeninas (mostraron cystocarpos). Aunque quedaron muy pocas plantas de las cuerdas de cultivo fertilizadas, se notaron algunos juveniles con un talo más plano y ramificado que el de sus padres adheridos a la malla cilíndrica.

DISCUSION

Gracilaria tikvahiae crece típicamente en lugares semicerrados con fondos lodosos o arenosos (Bird *et al.*, 1977, Mathieson *et al.*,

These findings show that *Gracilaria tikvahiae* is capable of very rapid growth when it is exposed to high irradiance and high nutrient loads. Under favorable conditions, seaweed would take more nitrogen than required for growth. This effect has been seen in *G. tikvahiae* that accumulated enough nitrogen in six hours to sustain growth for up to two weeks of growth without being nutrient limited (Ryther *et al.*, 1981). Our tank cultures (which were not fertilized) showed a pale coloration, typical of nitrogen depleted plants (Lapointe, 1981; Lapointe *et al.*, 1984), after three weeks of growth at rates greater than $10\% \text{ d}^{-1}$. This effect was noticed on plants that due to their relatively high irradiance exposure, grow at rates above 5% day.

When we wanted to culture *Gracilaria tikvahiae* outside of its typical environment (high nutrient regeneration, high turbidity), it was necessary to consider an additional source or nutrients that would maintain high growth rates enhanced by the relatively high irradiances near the surface. Having this in mind, the BEEF was located along a tidal front. These fronts accumulate organic matter and they commonly are areas of high productivity (Holligan, 1981). They are considered as a source of nutrients but they also accumulate high amounts of larvae.

Although we had our cultures on the pathway of a front, the supply of nutrients apparently was not enough to sustain maximum growth of *Gracilaria tikvahiae* under the light regime present. Moreover, we had some negative effects because the front provided great amounts of larvae which colonized the structure and the plants during summer.

Hanisak (1983) mentioned that the most convincing evidence that there is nutrient limitation is the increase in growth in the algae after fertilization. In our open water cultures, the fertilized plants showed a better appearance, color and growth than the plants that were not fertilized. Our results, however, are only descriptive because the type of algae and the conditions of our cultures did not allow us to measure growth quantitatively without harming the plants severely. On the other hand, there was a strong recovery when

1981, Penniman 1984), donde existe un fuerte reciclamiento de nutrientes (Valiela, 1983). A su vez, *G. tikvahiae* ha sido caracterizado por su alta afinidad de absorción de nutrientes disueltos en el agua (Penniman 1983) y su preferencia por amonio sobre nitratos y nitritos. En sus estudios de cultivo de *G. tikvahiae* en tanques, Lapointe y Ryther (1978) reportan un crecimiento hasta de 60 % por día para plantas vegetativas fertilizadas.

Estos conocimientos muestran que *G. tikvahiae* es un alga capaz de crecer rápidamente cuando esta expuesta a altas intensidades de luz y nutrientes. Bajo condiciones favorables, las macroalgas toman más nitrógeno del que pueden utilizar en ese momento para su crecimiento. Este efecto es demostrado dramáticamente por *G. tikvahiae* que puede tomar suficiente nitrógeno en seis horas para durar hasta seis semanas de crecimiento sin ser limitado por nutrientes (Ryther et al., 1981). Nuestros cultivos en tanques (los cuales no fueron fertilizados) mostraron una coloración pálida típica de plantas deficientes en nutrientes (Lapointe 1981, Lapointe et al., 1984) después de tres semanas de crecimiento mayor de 10 % por día. Este efecto se notó en las plantas que, debido a la relativa alta intensidad de luz a la que fueron expuestas, crecieron a razones mayores de 5.0 % por día.

Cuando se quiso cultivar *G. tikvahiae* fuera de su ambiente típico (alta regeneración de nutrientes, alta turbidez), fue necesario considerar una fuente adicional de nutrientes que mantuviera el alto crecimiento estimulado por la relativamente alta irradiación. Teniendo esto en mente, la estructura flotante (BEEF) fue colocada en la trayectoria de un frente oceánico. Estos frentes comúnmente acumulan materia orgánica y son zonas de alta productividad (Holligan 1981). Se consideran fuentes de nutrientes pero a su vez acumulan una gran cantidad de larvas.

A pesar de tener nuestros cultivos en la trayectoria de un frente oceánico, no hubo un aporte suficiente de nutrientes para mantener un máximo crecimiento con las condiciones de luz presentes. Mas sin embargo, se obtuvo un resultado adverso ya que el frente aportó una gran cantidad de organismos sobre las plantas y la estructura durante el verano.

the plants close to the surface where moved to deeper waters. The type of structures and locations tested here do not seem adequate for summer plant such as *Gracilaria tikvahiae*. Often these plants depend on nutrients recycled at high rates in mud flats during the summer.

CONCLUSIONS

Oyster and mussel shells were ideal substrata for the culture of *Gracilaria tikvahiae* in open waters where the plants were exposed to strong currents. These experiments, however, indicate that the available nutrients on the surface waters of the BEEF were not sufficient to maintain high growth rates of this species (under high light conditions). Lowering the plants to deeper water resulted in improved plant condition, but growth rates decreased and fouling increased. To make the culture of *G. tikvahiae* possible at the BEEF, artificial fertilization would be required to maintain faster growth. Otherwise, it would be difficult for the plants to overcome fouling. Further, a different locality that would reduce the amount of colonization would probably make this type of culture possible.

Hanisak (1983) menciona que la evidencia más convincente de que existen una limitación por nutrientes, es el incremento en el crecimiento de la macroalga después de fertilizarse *in situ*. En el presente estudio, las plantas fertilizadas de los cultivos en mar abierto mostraron una mejor apariencia, coloración y crecimiento que las plantas no fertilizadas. Los resultados en esta estación son solamente descriptivos, ya que el tipo de alga y las condiciones del cultivo no nos permitieron medir el crecimiento cuantitativamente sin dañar severamente a los ejemplares. Por otro lado, hubo una notable recuperación de los ejemplares cercanos a la superficie después de moverlas a mayor profundidad. El tipo de estructuras y lugares probados aquí no parecen adecuados para la planta de verano tal como *Gracilaria tikvahiae*. Frecuentemente estas plantas dependen del alto reciclamiento de nutrientes de los lodos de marismas durante el verano. Fertilización artificial, y un cambio

de localidad que redujera la cantidad de colonizadores, podría hacer este tipo de cultivo posible.

CONCLUSIONES

Las conchas de ostión y mejillón resultaron un sustrato ideal para el cultivo de *Gracilaria tikvahiae* en aguas no protegidas donde las plantas son expuestas a fuertes corrientes. Los experimentos, sin embargo, indicaron que los nutrientes disponibles en las aguas superficiales de la estación alejada de la costa (BEEF), no son suficientes para mantener altas razones de crecimiento de esta especie bajo altas condiciones de luz. Al bajar los cultivos a mayor profundidad, se obtuvo una mejoría en la condición de la planta, pero el crecimiento disminuye y con ello el decaimiento por la alta fijación de epifauna. Para hacer posible el cultivo de *G. tikvahiae* sobre el BEEF en la localidad estudiada, se requería de una fertilización artificial que garantizara un crecimiento más rápido. De otra manera, sería difícil a las plantas superponerse a la intensa colonización de organismos planctónicos. Además una localidad diferente que redujera la cantidad de colonizadores, probablemente haría este tipo de cultivos posible.

LITERATURA CITADA

- Bird, C. U., Edelstein, T. and McLachlan, J. (1977) Studies on *Gracilaria*. Experimental observations on growth and reproduction in Pomquet Harbour, Nova Scotia. *Naturaliste can* 104: 245-255
- Bold, H. C. and Wynne, M. J. (1978) Introduction to the Algae. Structure and Reproduction. Prentice - Hall Inc. Englewood Cliffs, N.J. 706 pp.
- Brinkhuis, B. H. and Hanisak, M. D. (1982) Development of a marine biomass program in New York In: 1981. International Gas Research Conference, pp. 682-92. Government Institutes, Inc. Rockville.
- Brinkhuis, B. H., Macler, B. A., Hanisak, M. D., Zatorski, R., Liu, P. and Tsay, T. K. (1983a) Biological studies in the New York Marine Program. in: Seaweed Raft and Farm Design in the United States and China. McKay, L. (ed). New York Sea Grant Institute, Albany. pp 6-1 to 6-19.
- Brinkhuis, B. H., Breda, V. A., Tobin, S. and Macler, B. A. (1983b) New York Marine Biomass Program-Culture of *Laminaria saccharina*. J. World Mariculture Soc. 14: 360-79.
- Brinkhuis, B. H., Mariani, E. C., Breda, V. A. and Brady-Cambell, M. M. (1984) Cultivation of *Laminaria Saccharina* in the New York Marine Biomass Program. Proc. Int. Seaweed Symp. II, Hydrobiol. 116/117: 266-71.
- Edelstein, T., Bird, C. J. and McLachlan. (1976) Studies on *Gracilaria* 2. Growth under greenhouse conditions. *Can. J. Bot.* Vol. 54: 2275-2290.
- Edelstein, T. (1977) Studies on *Gracilaria* sp. Experiments on inocula incubated under greenhouse conditions. *J. exp. Mar. Biol. Ecol.* Vol.30: 249-259.
- Gallagher, S. B and Humm, H. J. (1983) Techniques of laboratory Cultivation of Marine Algae. Gas Research Institute, Topical Report Dec 82-83. pp. 119.
- Hanisak, M. D. (1981a) Methane Production from the red seaweed *Gracilaria tikvahiae*. *Proc. Int. Seaweed Simp.* 10: 681-6.
- Hanisak, M. D. (1981b) Recycling residuos from anaerobic digestors as a nutrient source for seaweed growth. *Bot. Mar.* 24: 57-61.
- Hanisak, M. D. (1983) Nitrogen Relationships of Marine Macroalgae. In: Nitrogen in Marine Environment, Carpenter, E. J. and Capone, D. G. (eds.) Academic Press. Inc. New York. pp. 699-730.
- Hanisak, M. D. and Ryther, J. H. (1983) Land based cultivation of seaweeds: an assessment of their potential yields for "energy farming". In: Seaweed Raft and Farm Design in the United States and China, McKay, L.B., Ceds. pp. 4-1 to 4-10. New York Sea Grant Institute, Albany.

- Holligan, P. (1981) Biological Implications of fronts on the Northwest European continental shelf. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A.* 302: 547-562.
- Lapointe, B. E. (1981) The effects of light and nitrogen on growth, pigment content, and biochemical composition of *Gracilaria foliifera*, *V. angustissima* (Gigartinales, Rhodophyta). *J. Phycology* 17: 90-95.
- Lapointe, B. E. and Ryther, . H. (1978) Some aspects of the growth and yield of *Gracilaria tikvahiae* in culture. *Aquaculture*, 15: 185-193.
- Lapointe, B. E., Dawes, C. J. and Tenore, . R. (1984) Interaction between light and temperature on the physiological ecology of *Gracilaria tikvahiae* (Gigartinales: Rhodophyta). II. Nitrate uptake and levels of pigments and chemical constituents. *Mar. Biol.* 80: 171-178.
- Li, R. Z., Chong, R. Y. and Meng, Z. C. (1984) A preliminary study of raft cultivation of *Gracilaria verrucosa* and *Gracilaria sjoestedtii*. *Hydrobiologia* 116/117: 252-254.
- Mathieson, A. C., Reynolds, N. B. and Hehre, E. J. (1981) Investigations of New England Marine Algae II: The species composition, Distribution and Zonation of seaweeds in the Great Bay Estuary System and The Adjacent Open Coast of New Hampshire. *Bot. Marina*. Vol. XXIV: 533-545.
- Penniman, C. A. (1983) Ecology of *Gracilaria tikvahiae* McLachlan (Gigartinales, Rhodophyta) in the Great Bay Estuary, New Hampshire. Ph. D. Thesis. University of New Hampshire. pp. 267.
- Ren, G. Z., Wang, J. C. and Chen, M. Q. (1984). Cultivation of *Gracilaria* by means of low rafts. *Hydrobiologia* 116/117: 72-76.
- Ryther, J. H., DeBusk, J. A. and Williams, L. D. (1981) Nitrogen uptake and storage by the red algae *Gracilaria tikvahiae* (McLachlan, 1979) *Aquaculture* 26: 107-115.
- Shang, Y. C. (1976) Economic aspects of *Gracilaria* culture in Taiwan. *Aquaculture* 8: 1-7.
- Sokal, R. R. and Rohlf, F. J. (1981) Biometry. Second Edition W. H. Freeman and Company. San Francisco. pp. 859.
- Valiela, I. (1983) Nitrogen in Salt Marsh Ecosystems. In: Nitrogen in the Marine Environment. E. J. Carpenter and Capone, D. G. (eds.). Academic Press. New York. 649-678.