

**EFFECTO DEL USO DEL CLORO COMERCIAL (HClO_3Na) SOBRE EL
CRECIMIENTO DE ALGAS EPÍFITAS Y SU HOSPEDANTE
Gigartina pectinata DAW. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)**

**EFFECT OF USING COMMERCIAL CHLORINE (HClO_3Na) ON THE
GROWTH OF EPIPHYTE ALGAE AND THEIR HOST
Gigartina pectinata DAW. (GIGARTINALES, RHODOPHYTA)**

Isaí Pacheco-Ruiz¹
Alberto Gálvez-Telles¹
José Antonio Zertuche-González¹
José Luis Pech-Pacheco²

¹ Instituto de Investigaciones Oceanológicas
Universidad Autónoma de Baja California
Apartado postal 453
Ensenada 22800, Baja California, México

² División de Oceanología, Departamento de Ecología
Centro de Investigación Científica y de Educación Superior de Ensenada (CICESE)
Apartado postal 2732
Ensenada 22800, Baja California, México

Recibido en abril de 1997; aceptado en junio de 1997

RESUMEN

Cultivos bajo condiciones controladas del alga roja, *Gigartina pectinata* Daw., se trataron con cloro comercial (HClO_3Na) para reducir el crecimiento de epífitas. Se utilizaron distintas concentraciones (750, 500, 250 y 100 $\mu\text{L L}^{-1}$) de cloro comercial, con diferentes tiempos de tratamiento (60, 45, 30 y 15 min) por semana. Tanto las epífitas como *G. pectinata* se vieron afectadas en su crecimiento con altas concentraciones (750 y 500 $\mu\text{L L}^{-1}$). A una menor concentración (100 $\mu\text{L L}^{-1}$), el crecimiento de *G. pectinata* no fue afectado significativamente; sin embargo, la concentración fue letal para las epífitas. La reducción de epífitas en todos los tratamientos fue del 100% después de cuatro semanas.

Palabras clave: control de epífitas con cloro comercial, *Gigartina pectinata*, cultivos, Rhodophyta, algas filamentosas.

ABSTRACT

The red alga, *Gigartina pectinata* Daw., was cultured under controlled conditions to reduce the growth of epiphytes. Commercial chlorine (HClO_3Na) in different concentrations (750, 500, 250 and 100 $\mu\text{L L}^{-1}$), with different treatment times (60, 45, 30 and 15 min), was used each week for four weeks. The growth of all epiphytes and *G. pectinata* was adversely affected with high concentrations (750 and 500 $\mu\text{L L}^{-1}$). At the lowest concentration (100 $\mu\text{L L}^{-1}$), the growth of *G. pectinata* was not significantly affected; however, the concentration was lethal for epiphytes. The reduction of epiphytes in each treatment was 100% after four weeks.

Key words: epiphyte control with commercial chlorine, *Gigartina pectinata*, cultivation, Rhodophyta, filamentous algae.

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales factores adversos para mantener cultivos unialgales de macroalgas son las epífitas, las cuales se establecen cubriendo el talo, compiten por luz y nutrientes, y afectan el crecimiento de las plantas (Lindsay y Saunders, 1980; Santelices y Doty, 1989).

Se ha intentado controlar las epífitas en cultivos por métodos mecánicos, biológicos y químicos (Fletcher, 1995). La limpieza manual (Trainor, 1978) y la utilización de cepillos de nylon suave (Zertuche-González *et al.*, 1987) han sido métodos efectivos en cultivos con bajas densidades algales (Bidwell *et al.*, 1985). Polne *et al.* (1980) utilizaron ultrasonido para la remoción de epífitas en *Gelidium robustum* (Gardn.) Hollenb. *et* Abb., *Eucheuma uncinatum* (Setch. *et* Gardn.) Dawson y *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. Friedlander y Ben-Amotz (1991) reportan que incrementos en la circulación del agua y bajos niveles de aeration pueden reducir los niveles de epifitismo en *Gracilaria*.

También se han utilizado organismos herbívoros, ya que pueden ser capaces de reducir el crecimiento de epífitas, pero existe el riesgo de que pastoreen la cosecha de interés o inhiban el crecimiento (Breden y Bird, 1988). El camarón *Penaeus monodon* o los peces *Chanos chanos* y *Tilapia mossambica* se han usado para controlar epífitas en cultivos de *Gracilaria* sp. en Taiwán (Chiang, 1981; Shang, 1976).

El control químico ha dado buen resultado; sin embargo, tal medida debe ser usada con precaución. En cultivos de *Chondrus crispus* Stackhouse, se ha controlado el crecimiento de *Ectocarpus* sp. con niveles altos de fertilizantes. Algunos autores han demostrado que las epífitas pueden ser inhibidas por el control del pH en los cultivos (Friedlander, 1991); el utilizar altos pH ha resultado efectivo (Haglund, 1992). El crecimiento de *Ulva* sp. se ha reducido bajando los niveles de fertilizante (Bidwell *et al.*, 1985). El sulfato de cobre se ha utilizado para controlar el crecimiento de *Chaetomorpha* sp. y *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link en cultivos de *Gracilaria* (Lin y Lin, 1981; Chen *et al.*, 1981; Haglund, 1992). Otros compuestos utilizados en el control de algas epífitas son

INTRODUCTION

One of the main adverse factors in unialgal cultures of macroalgae is epiphytes that cover the thallus, compete for light and nutrients, and affect the growth of the plants (Lindsay and Saunders, 1980; Santelices and Doty, 1989).

Mechanical, biological and chemical methods have been used to control epiphytes in cultures (Fletcher, 1995). Manual cleaning (Trainor, 1987) and the use of soft, nylon brushes (Zertuche-González *et al.*, 1978) have proven effective in cultures with low algal densities (Bidwell *et al.*, 1985). Polne *et al.* (1980) used ultrasound to remove epiphytes from *Gelidium robustum* (Gardn.) Hollenb. *et* Abb., *Eucheuma uncinatum* (Setch. *et* Gardn.) Dawson and *Macrocystis pyrifera* (L.) C. Ag. Friedlander and Ben-Amotz (1991) report that increased water circulation and low levels of aeration can reduce the degree of epiphytism in *Gracilaria*.

Herbivores have also been used to reduce the growth of epiphytes, but there is the risk of them grazing on the harvest or inhibiting growth (Breden and Bird, 1988). The shrimp *Penaeus monodon* or the fishes *Chanos chanos* and *Tilapia mossambica* have been used to control epiphytes in cultures of *Gracilaria* sp. in Taiwan (Chiang, 1981; Shang, 1976).

Chemical methods have proven effective, but they should be used with care. In cultures of *Chondrus crispus* Stackhouse, the growth of *Ectocarpus* sp. has been controlled with high levels of fertilizer. Some authors have shown that epiphytes can be inhibited by controlling the pH of the culture (Friedlander, 1991); the use of high pH levels has been effective (Haglund, 1992). The growth of *Ulva* sp. has been reduced by lowering the levels of fertilizer (Bidwell *et al.*, 1985). Copper sulfate has been used to control the growth of *Chaetomorpha* sp. and *Enteromorpha intestinalis* (L.) Link in cultures of *Gracilaria* (Lin and Lin, 1981; Chen *et al.*, 1981; Haglund, 1992). Other compounds used to control epiphytic algae include potassium permanganate, mercury and ammonium sulfate (Trainor, 1978). In both fresh and sea water, calcium oxide (quicklime) has proven to be an excellent controller of macroscopic

permanganato de potasio, mercurio y sulfato de amonio (Trainor, 1978). Tanto en agua dulce como en agua de mar, se ha utilizado el óxido de calcio (cal viva) como un excelente controlador de epífitas macroscópicas (Huet, 1983; Pacheco-Ruiz *et al.*, 1991). Este trabajo prueba la eficiencia del cloro (HClO_3Na) comercial (6%) en el control de epífitas, ya que este compuesto se utiliza en la esterilización de agua de mar para el cultivo de microalgas y macroalgas (Pruder y Bolton, 1978; Ugarte y Santelices, 1992). Se conoce que tratamientos con 4 a 6% de cloro comercial de 6 a 10 h matan el 80% de los talos de *Enteromorpha* y *Ectocarpus*, reduciendo la producción de la planta hospedante en un 40% (Ugarte y Santelices, 1992). Fletcher (1995) menciona que la mayoría de la investigación que se ha realizado sobre epifitismo ha sido descriptiva; por esta razón, se requieren más estudios experimentales. Por lo tanto, esta investigación se centra en demostrar que el hipoclorito de sodio (HClO_3Na) puede ser usado como un controlador de las epífitas filamentosas más comunes en cultivos de *Gigartina pectinata*, bajo condiciones controladas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las algas epífitas filamentosas más comunes en tanques de cultivo exteriores en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Oceanológicas, de la Universidad Autónoma de Baja California, son *Ectocarpus* sp. y, esporádicamente, algunas Ceramiales. Ejemplares de estos géneros y del alga roja hospedante, *G. pectinata*, fueron transportados al laboratorio. Con ellos, se diseñó un experimento bajo condiciones controladas para reducir el crecimiento de epífitas, utilizando distintas concentraciones de cloro comercial (750, 500, 250 y 100 $\mu\text{L L}^{-1}$) y diferentes tiempos de tratamiento (60, 45, 30 y 15 min) por semana. El experimento tuvo una duración de cuatro semanas y se realizó por triplicado ($n = 3$) en un incubador a $18 \pm 1^\circ\text{C}$ de temperatura, $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de irradiancia y un fotoperiodo de 12:12, utilizando como medio de cultivo Provasoli (1968), con cambios cada tres días. Cada tratamiento tuvo su testigo.

epiphytes (Huet, 1983; Pacheco-Ruiz *et al.*, 1991). This study tests the efficiency of 6% commercial chlorine (HClO_3Na) to control epiphytes, since this compound is used to sterilize sea water for the culture of micro- and macro-algae (Pruder and Bolton, 1978; Ugarte and Santelices, 1992). It is known that treatments of 4-6% commercial chlorine during 6-10 h kill 80% of the thalli of *Enteromorpha* and *Ectocarpus*, reducing production of the host plant by 40% (Ugarte and Santelices, 1992). Fletcher (1995) states that most of the research regarding epiphytism has been descriptive; hence, more experimental studies are needed. This study focuses on the use of sodium hypochlorite (HClO_3Na) to control the most common filamentous epiphytes in cultures of *Gigartina pectinata*, under controlled conditions.

MATERIALS AND METHODS

The most common filamentous epiphytes in outdoor culture tanks at the Instituto de Investigaciones Oceanológicas, of the Universidad Autónoma de Baja California, are *Ectocarpus* sp. and, occasionally, some Ceramiales. Samples of these genera and of the red-alga host, *G. pectinata*, were taken to the laboratory. These were used to design an experiment to reduce the growth of epiphytes under controlled conditions, using different concentrations of commercial chlorine (750, 500, 250 and 100 $\mu\text{L L}^{-1}$) and different treatment times (60, 45, 30 and 15 min) per week. The experiment lasted four weeks and was conducted in triplicate ($n = 3$) in an incubator at $18 \pm 1^\circ\text{C}$, with an irradiance of $45 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ and a photoperiod of 12:12, using Provasoli (1968) as culture medium, which was changed every three days. There were test blanks for each treatment.

Growth of the samples and of the respective blanks was measured in wet weight every seven days for four weeks, using Hoyle's (1978) equation:

$$G = [(W_t/W_0)^{1/t} - 1] \times 100$$

where G is the percent increase in wet weight per day; t , time; W_0 , initial weight; and W_t , weight after t days.

Se midió el crecimiento en peso húmedo cada siete días por cuatro semanas, sobre los experimentos y testigos respectivos, utilizando la expresión de Hoyle (1978):

$$G = [(W_t/W_0)^{1/7} - 1] \times 100$$

donde G es el porcentaje en incremento de peso húmedo por día, t el tiempo, W_0 el peso inicial y W_t el peso después de t días.

A los datos se les probó homogeneidad de varianza con una prueba de Cochran y Bartlett; posteriormente, se les aplicó un ANOVA (análisis de dos vías) y una prueba Tukey HSD *a posteriori* paramétrica (Sokal y Rohlf, 1979), en el programa Statistical ver. 3.0. Se utilizó un nivel de significancia de $P = 0.05\%$. El análisis estadístico arrojó homogeneidad de varianza ($P = 0.89$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El cloro comercial controló las epífitas en todos los tratamientos e independientemente del tiempo de exposición; se presentó muerte total de todas ellas a las cuatro semanas. Sin embargo, el testigo de epífitas mostró un crecimiento promedio de $6.2 \pm 0.3\%$ por día al final del experimento.

El ANOVA demostró que el tiempo de tratamiento, la concentración y su interacción fue altamente significativa ($P < 0.0001$). La prueba Tukey HSD *a posteriori* arrojó diferencias significativas del testigo de *G. pectinata* con todos los tratamientos, a excepción del de 60 min y 100 μL de concentración (fig. 1). Sin embargo, todos los tratamientos de 100 μL resultaron ser iguales entre sí, independientemente del tiempo de tratamiento, y significativamente diferentes ($P < 0.5$) de todas las demás concentraciones y tiempos de experimentación (fig. 1).

De los tratamientos aplicados, los de menor concentración resultaron ser los mejores, ya que redujeron las epífitas en un 100% con menor efecto sobre el crecimiento de *G. pectinata* (fig. 1). Sin embargo, se recomienda utilizar el tratamiento de 60 min y 100 μL por semana, ya que éste demostró ser significativamente igual al testigo ($P = 0.082$). Este resultado es diferente del obtenido por Ugarte y Santelices

Homogeneity of variance of the data was analyzed with Cochran and Bartlett's test. A two-way ANOVA and Tukey's *a posteriori* HSD parametric test (Sokal and Rohlf, 1979) were then conducted, using the Statistical ver. 3.0 program. A significance level of $P = 0.05\%$ was used. The statistical analysis showed homogeneity of variance ($P = 0.089$).

RESULTS AND DISCUSSION

The commercial chlorine controlled the epiphytes in all the treatments and regardless of exposure time; there was complete mortality at four weeks. However, the epiphyte blank presented an average growth of $6.2 \pm 0.3\%$ per day at the end of the experiment.

The ANOVA showed that treatment time, concentration and their interaction were highly significant ($P < 0.0001$). Tukey's *a posteriori* HSD test showed significant differences in the *G. pectinata* blank in all the treatments, except at 60 min and 100- μL concentration (fig. 1). However, all the 100- μL treatments were the same, regardless of treatment time, as well as significantly different ($P < 0.5$) from the other concentrations and treatment times (fig. 1).

The treatments with lower concentrations proved to be the most effective, since there was a 100% reduction in the epiphytes with less effect on the growth of *G. pectinata* (fig. 1). However, the treatment of 60 min and 100 μL per week is recommended, since this was significantly the same as the blank ($P = 0.082$). This differs from that obtained by Ugarte and Santelices (1992), who observed a 40% reduction in the production of *Gracilaria chilensis* Bird McLachlan et Oliveira, which may be attributed to the amount of time the plants were exposed to chlorine (6-10 h). In this study, there was a 7% reduction in the production of *G. pectinata*, which was not significantly different from that of the blank ($P = 0.082$).

Sladeckova and Sladecek (1967) state that an ideal algicide should be selective of the nuisance alga, nontoxic, harmless, without negative influence on water quality, nonaccumulative, easy to incorporate into the natural cycles, noncorrosive and harmless to equipment, effective under any condition, easy to

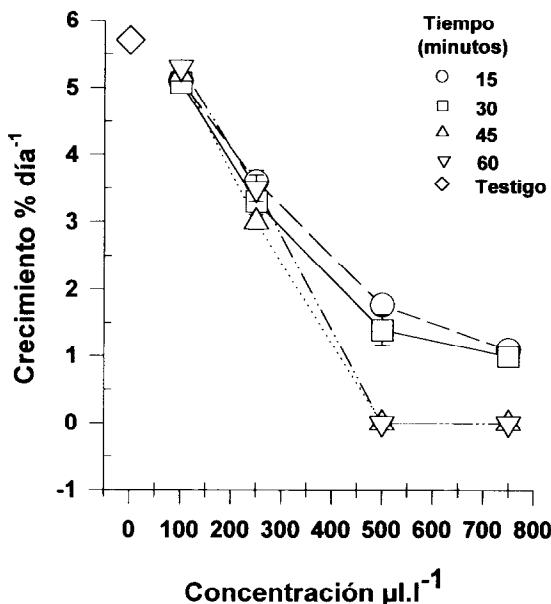


Figura 1. Efecto del cloro sobre el crecimiento de *Gigartina pectinata* ($X \pm \text{EE}$, $n = 3$), después de cuatro semanas.

Figure 1. Effect of chlorine on the growth of *Gigartina pectinata* ($\bar{X} \pm \text{SE}$, $n = 3$), after four weeks.

(1992), ya que ellos encuentran una reducción en la producción de *Gracilaria chilensis* Bird McLachlan *et al.* en un 40%, pudiendo ser atribuido al amplio periodo de exposición al que fueron sometidas las plantas al cloro (6-10 h). En esta investigación se presentó una reducción en la producción de *G. pectinata* del 7%, la cual no fue significativamente diferente a la del control ($P = 0.082$).

Sladeckova y Sladecek (1967) mencionan que un algicida ideal debe ser selectivo del alga problema, no tóxico, inofensivo, sin influencia negativa en la calidad del agua, no acumulativo, de fácil incorporación a los ciclos naturales, no corrosivo e inofensivo al equipo, efectivo bajo cualquier condición, de fácil aplicación, económico, disponible para uso continuo y de fácil manejo de las concentraciones. Es difícil encontrar un algicida con todas estas cualidades; sin embargo, el cloro demostró ser efectivo, disponible para uso continuo y de fácil aplicación para algunas de las especies filamentosas (Ectocarpales y Ceramiales) más problemáticas.

handle, economical, available for continuous use and have a concentration that is easy to control. It is difficult to find an algicide with all these characteristics; however, for some of the more problematic filamentous species (Ectocarpales and Ceramiales), the chlorine was effective, available for continuous use and easy to handle. Therefore, the use of commercial chlorine is recommended to control marine filamentous epiphytes under controlled conditions, when unialgal cultures are desired; however, each treatment might have different effects on the epiphytes found, and this requires further investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the financial support from the Programa Regional del Sistema de Investigación del Mar de Cortes (SIMAC/94 CM-11) and from the Universidad Autónoma de Baja California. Our thanks to Fernando Garza for his comments on the statistical analysis, and to

Por lo tanto, se recomienda el uso del cloro comercial para controlar epífitas marinas filamentosas cuando se intente realizar cultivos unialgales, bajo condiciones controladas, tomando en consideración que el tratamiento puede tener efectos diferenciales sobre las epífitas encontradas, lo cual debe ser investigado en el futuro.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Programa Regional del Sistema de Investigación del Mar de Cortés (SIMAC/94 CM-11) y a la Universidad Autónoma de Baja California el apoyo financiero para la realización de esta investigación; a Fernando Garza sus comentarios al realizar el análisis estadístico y a los revisores Alejandro H. Buschmann y Germán Bula-Meyer sus respectivas sugerencias.

REFERENCIAS

- Bidwell, R.G., McLachlan, J. and Lloyd, D.H. (1985). Tank cultivation of Irish moss. *Chondrus crispus* Stackh. Bot. Marina, 28: 93-97.
- Breden, C. and Bird, K.T. (1988). Use of *Poecilia latipinna* (Sailfin Molly) for control of nuisance algae in *Gracilaria verrucosa* strain G-16 (seaweed) culture. J. World Aquat. Soc., 3: 161-162.
- Chen, C.S., Alvarez, H. and Tsai, C.S. (1981). Effects of copper-algaicide, cutrine-plus, on *Enteromorpha intestinalis* (L.). J. Fish. Soc. Taiwan, 8: 89-97.
- Chiang, Y.M. (1981). Cultivation of *Gracilaria* (Rhodophycophyta, Gigartinales) in Taiwan. Int. Seaweeds Symp., 10: 569-574.
- Fletcher, R.L. (1995). Epiphytism and fouling in *Gracilaria* cultivation: an overview. J. Appl. Phycol., 7: 325-333.
- Friedlander, M. (1991). Growth rate, epiphyte biomass and agar yield of *Gracilaria conferta* in an annual outdoor experiment. Irradiance and nitrogen. Bioresource Technol., 38: 203-208.
- Friedlander, M. and Ben-Amotz, A. (1991). The effect of light and ammonium on growth, the reviewers Alejandro H. Buschmann and Germán Bula-Meyer for their suggestions.
- English translation by Jennifer Davis.
- epiphytes and chemical constituents of *Gracilaria conferta* in outdoor cultures. Bot. Marina, 34: 161-166.
- Haglund, K. (1992). Photosynthesis and growth of some marine algae, with emphasis on the Rhodophyte *Gracilaria tenuistipitata*. Acta Univ. Ups. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Science, 377. Uppsala, Sweden, 48 pp.
- Hoyle, M.D. (1978). Reproductive phenology and growth rates in two species of *Gracilaria* from Hawaii. J. Exp. Mar. Biol. Ecol., 35: 273-283.
- Huet, M. (1983). Tratado de Piscicultura. Mundi-Prensa, México, 503 pp.
- Lindsay, J.G. and Saunders, R.G. (1980). Enclosed floating culture of marine plants. In: I.A. Abbott, M. Foster and F. Eklund (eds.), Pacific Seaweed Aquaculture. Sea Grant College Program, La Jolla, California, pp. 95-155.
- Lin, M.N. and Lin, K.Y. (1981). The toxicity of radapon (sodium dichloropironate) and cupric sulfate to *Gracilaria*, *Chaetomorpha* and some fishes. China Fish. Mon., 343: 3-9.
- Pacheco-Ruiz, I., Zertuche-González, J.A. y Escobar-Romero, G. (1991). Control de epífitas en cultivos exteriores del alga roja *Gelidium robustum* (Gardn.) Hollenb. & Abb. Rev. Inv. Cient., 2: 21-27.
- Polne, M., Gibory, A. and Neushul, M. (1980). The use of ultrasound for the removal of macro-algal epiphytes. Bot. Marina, 23: 731-734.
- Provasoli, L. (1968). Media and prospects for the cultivation of marine algae. In: A. Watanabe and A. Hattori (eds.), Culture and Collections of Algae. Proc. US-Japan Conf. Hakone, Sept. 1966. Jap. Soc. Pl. Physiol., pp. 63-75.
- Pruder, G.D. and Bolton, E.T. (1978). System configuration and performance: Bivalve

- molluscan mariculture. Proc. 9th Annual Meeting World Mariculture Soc., pp. 747-759.
- Santelices, B. and Doty, M.S. (1989). A review of *Gracilaria* farming. Aquaculture, 78: 95-133.
- Shang, Y.C. (1976). Economic aspects of *Gracilaria* culture in Taiwan. Aquaculture, 8: 1-7.
- Sladeckova, A. and Sladecek, V. (1967). Algicides-friends or foes? In: F.D. Jackson (ed.), *Algae, Man and the Environment*. Syracuse University Press, Syracuse, New York, pp. 441-458.
- Sokal, R.R. y Rohlf, F.J. (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. H. Blume Ediciones, Rosario, Madrid, 832 pp.
- Trainor, F.R. (1978). Introductory Phycology. John Wiley, USA, 418 pp.
- Ugarte, R. and Santelices, B. (1992). Experimental tank cultivation of *Gracilaria chilensis* in central Chile. Aquaculture, 101: 7-16.
- Zertuche-González, J.A., García-Esquivel, Z. y Brinkhuis, H.B. (1987). Cultivo en tanques exteriores del alga roja *Eucheuma uncinatum* del Golfo de California. Ciencias Marinas, 13: 1-18.