



Efecto de luces LED y fluorescentes sobre el crecimiento y la biomasa de *Thalassiosira pseudonana* (Cleve, 1873)

Effect of LED and fluorescent lights on growth and biomass of *Thalassiosira pseudonana* (Cleve, 1873)

Autores: María Guadalupe Bravo Montesdeoca^{1,2}
César Lodeiros Seijo^{1,3}
Edgar Zapata Vivenes^{1,3,4}
José Javier Alió Mingo⁵

Dirección para correspondencia: lupebravom@yahoo.com

Recibido: 19-10-2020

Aceptado: 12-12-2020

Resumen

En búsqueda de mejorar la producción de la microalga *Thalassiosira pseudonana*, utilizada frecuentemente como alimento para larvas y juveniles de diversas especies de interés acuícola, en este estudio se evaluó la incidencia de diodos emisores de luz (LED) y luces fluorescentes (F) en su crecimiento y biomasa celular. Seis repeticiones de la cepa *T. pseudonana*, preparada en agua de mar filtrada tratada con UV y medio nutritivo Guillard F2 enriquecido con Na_2SiO_3 , fueron sometidas a 4200 lux ($\pm 5\%$) emitida desde luces LED y F. Se partió de inóculos en tubos de ensayo de 20 mL y trasvasados a recipientes de mayor volumen cada 3 días, hasta alcanzar 15 L en bolsas plásticas a los 14 días. Al término del ensayo, se determinó la densidad de microalgas, su biomasa

¹ Programa de Maestría en Acuicultura, Instituto de Postgrado, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador.

² Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez. Carrera de Tecnología Superior en Acuicultura, Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación. Ext. Jaramijó 132150, Manabí, Ecuador. E-mail: lupebravom@yahoo.com ORCID 0000-0002-7245-6731

³ Grupo de Investigación en Biología y Cultivo de Moluscos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Técnica de Manabí, Bahía de Caráquez, Manabí, Ecuador. E-mail: cesarlodeirosseijo@yahoo.es ORCID 0000-0001-9598-2235

⁴ Departamento de Biología, Escuela de Ciencias, Núcleo de Sucre, Universidad de Oriente, Venezuela. E-mail: edgar.zapata@utm.edu.ec ORCID 0000-0003-3720-5416.

⁵ Grupo de Investigación en Pesca y Acuicultura, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí, Manta, Ecuador. E-mail: josealio@hotmail.com ORCID 0000-0003-2210-6802

y masa celular. El crecimiento fue descrito mediante un modelo exponencial sin diferencia en las tasas de crecimiento entre L y F. La biomasa con L alcanzó $0,27 \pm 0,05$ mg L⁻¹ y con F $0,17 \pm 0,05$ mg L⁻¹, mientras que el peso celular fue $64,8 \pm 11$ pg con L y $41,2 \pm 12$ pg con F. Se concluye que la irradiación del cultivo microalgal con luces LED eleva la masa celular de *T. pseudonana*, lo cual podría representar mayor rendimiento al ser utilizado como alimento en organismos acuáticos.

Palabras clave: iluminación; nutrición; diatomea; tamaño celular.

Abstract

In search to improve the production of the microalgae *Thalassiosira pseudonana*, a species frequently used as food for larvae and juveniles of various species with aquaculture interest, in this study we evaluated the incidence of light-emitting diodes (LEDs) and fluorescent lights (F) on its growth and cell biomass. Six replicates of the *T. pseudonana* strain, prepared in filtered seawater treated with UV and Guillard F2 nutrient medium enriched with Na₂SiO₃, were subjected to 4200 lux ($\pm 5\%$) emitted from LED lights and F. The cultures were started from inoculums in 20 mL test tubes and transferred to larger volume containers every 3 days, until reaching 15 L in plastic bags after 14 days. At the end of the trials, the density of microalgae, their biomass and cell mass were determined. Growth was described by an exponential model with no difference in growth rates between L and F. The biomass with L reached 0.27 ± 0.05 mg L⁻¹ and with F 0.17 ± 0.05 mg L⁻¹, while the cell mass was 64.8 ± 11 pg with L and 41.2 ± 12 pg with F. It is concluded that the irradiation of the microalgal culture with LED lights increased the cell mass of *T. pseudonana*, which could represent greater performance when used as food for aquatic organisms.

Keywords: illumination; nutrition; diatom; cell size.

Introducción

Las microalgas constituyen el principal recurso alimenticio para los estadios larvarios y fases adultas de diversas especies mantenidas en instalaciones acuícolas. Adicionalmente, su uso se ha diversificado hacia la obtención de biocompuestos y combustibles (Hildebrand, 2012; Seckbach & Gordon, 2019) e inclusive como moduladores inmunológicos (Carballo et al., 2020). La composición, crecimiento y las propiedades nutritivas de las microalgas pueden variar de acuerdo a la disponibilidad de nutrientes, la intensidad y longitud de onda de la luz que se irradia, afectando su biomasa, actividad fotosintética y celular (Smayda, 2011; Richmond 2013; Harun et al., 2014; Vásquez-Suárez et al., 2013). De igual manera, algunas rutas metabólicas, tasa de crecimiento y composición bromatológica pueden cambiar según la calidad de la luz bajo la que se cultive (Sánchez-Saavedra & Maeda-Martínez, 2016). Por lo tanto, la producción de las microalgas puede ser mejorada cuando se emplean luz de diferentes fuentes de irradiancia (Demirbas, 2011). En este sentido, el uso de iluminación con luces LED, en comparación con las luces fluorescentes, resulta

atractivo por su menor consumo de energía, duración de las lámparas y la escasa producción de calor (Glemser et al., 2016; López-Rosales, et al., 2016). Así mismo, las luces LED permiten la selección de longitudes de onda específicas para iluminar cultivos de microalgas. El presente trabajo compara el efecto del uso luces LED y fluorescentes en la tasa de crecimiento y la producción de biomasa por la microalga *Thalassiosira pseudonana*, una microalga muy utilizada como alimento en las primeras etapas del ciclo de vida temprano de organismos acuáticos (Helm et al., 2006), o como alimento modificador del sabor de moluscos bivalvos (Hakamada et al., 2020).

Los ensayos se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Microalgas del Instituto Superior Tecnológico Luis Arboleda Martínez (ISTLAM), extensión Jaramijó, Manabí, Ecuador. La cepa de *T. pseudonana* (Cleve, 1873) fue suministrada por el Centro Nacional de Investigaciones Marinas (CENAIM-ESPOL) y mantenida en placas de agar (Bacto Agar 211040, Becton - Dickinson & Co.) preparado a razón de 15 g/L con agua de mar esterilizada y fertilizada con Guillard F/2 (Guillard, 1975), enriquecido con solución 0,05 molar de $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, a 18 °C con luz continua. Posterior a 10 días, la cepa fue sembrada en tubos de ensayo con 20 mL de agua de mar estéril fertilizada en medio Guillard F/2 enriquecida con $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ = (a razón de 1,5 mL/L). A los 5 días, los cultivos fueron escalados a fiolas de 150 mL y en secuencia, cada 3 días, fueron escalados a botellas de 2 L y a bolsas plásticas de 15 L.

El agua de mar utilizada en el mantenimiento de la cepa y los cultivos en tubos de ensayo y fiolas de 150 mL, fue circulada por un sistema de filtros de arena, grava y decantación, y esterilizada por luz UV. Adicionalmente, se desinfectó en una autoclave (Biobase modelo BKQ-Z50I) a 115 °C por 20 min. El agua de mar utilizada en los cultivos en botellas de 2 L y bolsas plásticas de 15 L, fue tratada previamente con hipoclorito de sodio al 8 %, para luego ser filtrada con una bolsa de malla de 1 μm , dejándola por 24 h con aireación y circulación, finalizando la depuración al neutralizar el hipoclorito de sodio con tiosulfato de sodio y vitamina C.

Se dispusieron dos tratamientos (irradiación con luces LED y con fluorescentes) con seis repeticiones cada uno. Los recipientes conteniendo la cepa *T. pseudonana* fueron irradiados independientemente a una intensidad de 4200 lux ($\pm 5\%$) con luces LED o fluorescentes, por un periodo de 14 días continuos durante todo el desarrollo del cultivo. La intensidad lumínica fue estimada con un radiómetro (Latnex modelo LM-50KL). La temperatura de los cultivos fue monitoreada todos los días a las 10:00 h con un termómetro Hanna, Checktemp 1, de precisión 0,1 °C.

Los cambios de la densidad del cultivo se estimaron dividiendo el número de células en cada recipiente de acuerdo con la ecuación:

$$\text{Densidad} = (\text{densidad} \times \text{volumen del recipiente}) / 15 \text{ L (1)}$$

La densidad poblacional se determinó diariamente, estimándose el tiempo que tardaba el cultivo en cada tipo de recipiente en culminar la fase exponencial del

crecimiento. Para esto, se utilizó una cámara de Neubauer de 0.1 mm de profundidad y un microscopio óptico (Muletc modelo ME400A) con el lente de objetivo de 40X. La densidad celular de *T. pseudonana* se estimó mediante la fórmula:

$$\text{Densidad (No. cél.* mL}^{-1}\text{)} = \frac{\Sigma \text{cuadrantes de la cámara Neubauer}}{4} \times 1000 \text{ (2)}$$

Las variaciones de la densidad de los cultivos con el tiempo en ambos tratamientos lumínicos, se ajustaron a un modelo exponencial:

$$\text{Densidad} = a * e^{(\mu * t)} \text{ (3)}$$

En donde a es una constante asociada al inóculo; e en la base de los logaritmos Neperianos; μ es la tasa de crecimiento y t es el tiempo. Según Widdle (2010), el tiempo generacional (t_d) se puede estimar por la relación:

$$\mu = \text{LN}(2)/t_d \text{ (4)}$$

donde LN(2) es el logaritmo Neperiano de 2, y se deduce que:

$$t_d = \text{LN}(2)/\mu \text{ (5)}$$

La biomasa final del cultivo fue determinada en las bolsas plásticas de 15 L, mediante tamizado en filtros de fibra de vidrio de 1,2 μm (CHMLAB GF3) con bomba al vacío (Tecnal-Te - 0581). Se extrajo de cada bolsa una muestra de 1 L, la cual fue filtrada en cuatro porciones de 250 mL. El filtrado fue lavado con agua destilada para eliminar los minerales y las sales del medio de cultivo. Seguidamente, los filtros fueron pesados y llevados a una estufa (Fisher-Scientific) a 110°C por 30 min; posteriormente, se dejaron enfriar en un desecador por 30 min, y se obtuvo la biomasa seca por diferencia de peso. El peso celular se estimó dividiendo la biomasa del cultivo en cada bolsa de 15 L entre la densidad respectiva.

La temperatura, biomasa y tamaño celular de las microalgas cultivadas bajo los dos tipos de luces se compararon mediante la prueba t de Student, verificando previamente la normalidad y homocedasticidad de los datos mediante pruebas de Shapiro-Wilk y Bartlett, respectivamente. Cuando no se cumplieron los requisitos de normalidad u homogeneidad de varianzas, se usó la prueba no paramétrica de Wilcoxon. La velocidad de crecimiento de los cultivos con ambos tipos de luces fue comparada mediante análisis de covarianza, estimando la semejanza de pendientes e interceptos de las regresiones (Zar 2014). Se consideraron diferencias significativas con un valor de $p < 0,05$. Los cálculos fueron efectuados mediante el programa estadístico Infostat (Di Rienzo et al., 2020).

Los cultivos de *T. pseudonana* iniciados con inóculos similares en botellas de 150 ml hasta bolsas plásticas de 15 L, cubrieron en 14 días toda su fase de escalamiento, siendo la temperatura registrada en los cultivos iluminados con luces fluorescentes mayor (promedio 23,9 °C; IC95% 23,7 – 24,0 °C) que los

cultivos iluminados con luces LED (promedio 20,8 °C; IC95% 20,7 – 21,0 °C), (Prueba t de Student =29,3; $p < 0.001$).

Luego de ajustar al modelo exponencial, según (3), las variaciones de la densidad en el tiempo de *T. pseudonana*, no se observaron diferencias significativas entre las tasas de crecimiento de los cultivos *T. pseudonana* mantenidas en luces LED y fluorescentes, estimándose una ecuación común: Densidad (mill. cel./mL) = $3,3 \cdot 10^{-5} \cdot e^{0,859 \cdot t}$ (Fig. 1). Dicho modelo explicó un 98% de la variabilidad en la densidad del cultivo durante el ensayo ($r^2 = 0,98$).

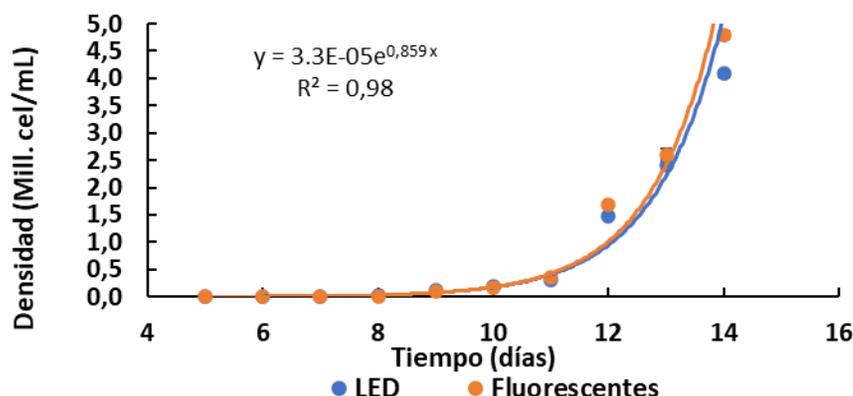


Figura 1. Densidad de *Thalassiosira pseudonana* cultivada bajo iluminación de luces LED y fluorescentes.

La tasa de crecimiento estimada (μ) tuvo un valor de 0,86 con un tiempo generacional de 19 h, o 1,26 divisiones por día. El modelo exponencial ajustado permitió estimar que, en 13 días de cultivo y a temperaturas de 21 a 24 °C, se pudo alcanzar densidades de $4 - 5 \times 10^6$ cel./mL a los 14 días de cultivo.

La densidad celular de la microalga al momento de la cosecha (bolsas de 15 L) no difirió significativamente en los cultivos con ambos tipos de luces; sin embargo, la biomasa del cultivo y la masa celular fueron significativamente mayores bajo iluminación con luces LED ($0,27 \pm 0,05$ mg L⁻¹ y $64,8 \pm 11,0$ pg) que con luces fluorescentes ($0,17 \pm 0,05$ mg L⁻¹ y $41,2 \pm 12,0$ pg) (Tabla 1).

Tabla 1. Características del cultivo (promedio \pm DE) durante la fase exponencial de crecimiento (fase de cosecha) de *Thalassiosira pseudonana* iluminados con luces LED y fluorescentes a 4200 lux, en bolsas plásticas de 15 L a 14 d de cultivo

Parámetro	Iluminación	
	LED	Fluorescente
Biomasa (mg/L)*	$0,27 \pm 0,05^a$	$0,17 \pm 0,05^b$
Densidad ($\times 10^6$ cel./mL)**	$4,13 \pm 0,04^a$	$4,15 \pm 0,14^a$
Masa celular (pg)*	$64,8 \pm 11^a$	$41,2 \pm 12^b$

* Prueba t de Student; ** Prueba de Wilcoxon; letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

Varios estudios muestran que las condiciones del cultivo de *T. pseudonana* pueden afectar el crecimiento. Por ejemplo, Price et al. (1987) reportan una tasa de crecimiento de 1,7 duplic./día cuando *T. pseudonana* fue cultivada a 18 °C y

que cepas de esta microalga provenientes del Mar de los Sargazos, crecían a una tasa de 2,1 duplic/día mientras que otra cepa proveniente de un estuario cerca de Nueva York, lo hizo a 3,6 duplic/día, siendo estas dos últimas mantenidas a 20 °C. No obstante, en nuestro estudio no se registró una diferencia significativa en los parámetros de duplicidad celular con luces LED o fluorescentes, a pesar de observarse tendencia hacia una mayor velocidad de crecimiento en los cultivos iluminados con luces fluorescentes en los últimos días del ensayo, posiblemente asociado a una mayor exposición de calor producida por las luces fluorescentes.

A diferencia de la tasa de crecimiento, la masa estimada de las células de *T. pseudonana* estuvo condicionada al tipo de luz empleado en el cultivo, alcanzando mayor masa celular promedio con luces LED (64,8 ± 11 pg) que en los cultivos con luces fluorescentes (41,2 ± 12 pg). En la literatura se reportan igualmente fuertes cambios en la masa celular de esta especie, pues Hakamada et al. (2020) reportan un valor de 103 pg para esta especie, mientras que Helm et al. (2006) lo refieren en 22 pg, lo cual soporta que las condiciones ambientales del cultivo afectan la masa celular que alcanza la microalga.

El efecto observado de las luces LED y fluorescentes sobre la biomasa de la microalga pudiera estar asociado a las características espectrales de ambos tipos de luces, provocando mayor eficiencia en la captación energética de la microalga con las luces LED. Heffernan et al. (2007) describen que los espectros de las luces LED y fluorescentes blancas con la misma potencia, muestran picos de intensidad energética entre poco menos de 400 nm y 700 nm. Sin embargo, la luz fluorescente muestra 5 picos de intensidad lumínica con escasa irradiancia entre ellos. Por su parte, la luz LED muestra una distribución más continua de la irradiancia concentrada en los 460 nm y 510-600 nm. Al respecto, Merzlyak et al. (2008) describen que la absorción espectral de *Thalassiosira weissflogii* se concentra en la región espectral de 350 a 500 nm y a 680 nm, con dos picos definidos en 440 y 680 nm. Estos resultados sugieren que las microalgas del género *Thalassiosira* estarían utilizando mayormente el espectro azul entre 400 y 500 nm donde la luz LED provee mayor intensidad luminosa, señalando una mayor eficacia en el desarrollo fisiológico de la microalga con luces LED. Vásquez-Villalobos et al. (2013) estiman que, para una potencia similar, la fuente de luz fluorescente tiene un coeficiente de utilización de 65% mientras que alcanza un 86% con una luz LED.

Conclusiones

Aunque la tasa de crecimiento de *T. pseudonana* en cuanto a su reproducción no se alteró por el tipo de luz, la biomasa celular de la microalga aumentó cuando los cultivos fueron irradiados con luces LED, produciendo una biomasa de cosecha en un 60% mayor. Se recomienda un estudio de la calidad de dichas biomásas y probarlas *in vivo* en organismos acuáticos, con especial referencia en la fase de zoea de camarones, para establecer su proyección como mejor rendimiento en la alimentación.

Referencias bibliográficas

- Brown, M.R., Dunstan, G.A., Norwood, S.J. & Miller, K.J. (1996) Effects of harvest stage and light on the biochemical composition of the diatom *Thalassiosira pseudonana*. *J. Phycology*, 32(1), 64-73. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1996.00064.x>
- Carballo, C., Mateus, A.P, Maya, C., Mantecón, L., Power, D.M. & Manchado, M. (2020). Microalgal extracts induce larval programming and modify growth and the immune response to bioactive treatments and LCDV in Senegalese sole post-larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 106, 263-272. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2020.07.020>.
- Demirbas, M.F. (2011). Biofuels from algae for sustainable development. *Applied Energy*, 88, 3473-3480. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.01.059>
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., González, L., Tablada, M., Robledo, C.W. (2020). InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. <http://www.infostat.com.ar>
- Glemser, M., Heining, M., Schmidt, J., Becker, A., Garbe, D., Buchholz, R. & Brück, T. (2016). Application of light-emitting diodes (LEDs) in cultivation of phototrophic microalgae: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 100(3), 1077-1088. <https://doi.org/10.1007/bit.25014>
- Guillard, R.R.L. (1975). *Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates*. En Smith, W.L. & Chanley, M.H. (eds.) *Culture of Marine Invertebrate animals*. Springer, Boston.
- Hakamada Mera, T., Alió Mingo, J. & Bravo Montesdeoca G. (2020). Cambios organolécticos inducidos en la ostra japonesa *Crassostrea gigas* con dietas de las microalgas *Thalassiosira pseudonana* y *Tetraselmis suecica*. *AquaTechnica*, 2(2), 121-129. <https://doi.org/10.33936/at.v2i2.2659>
- Harun, I., Yahya, L., Chik, M.N., Kadir, N.N.A. & Pang, M.A.M.A. (2014). Effect of natural light dilution on microalgae growth. *Int. J Chem. Eng. Appl.*, 5, 112-116. <https://doi.org/10.7763/IJCEA.2014.V5.362>
- Heffernan, W.J.B., Frater, L.P. & Watson, N.R. (2007). *LED replacement for fluorescent tube lighting*. Australasian Universities power engineering conference, Perth, Australia. <https://doi.org/10.1109/aupec.2017.4548064>
- Helm, M., Bourne, N. & Lovatelli, A. (2006). *Cultivo de bivalvos en criadero. Un manual práctico*. FAO Documento Técnico de Pesca 471, FAO Roma. <https://www.fao.org/3/y5720s/y5720s00.htm>
- Hildebrand, D., Smith, S.R., Traller, J.C. & Abriano, R. (2012). The place of diatoms in the biofuels industry. *Biofuels*, 3, 221-240. <https://doi.org/10.4155/bfs.11.157>
- Hsia, S. & Yang, S.K. (2015). Enhancing Algal Growth by Stimulation with LED Lighting and Ultrasound. *J. Nanomaterials*, Article ID 531352 | <https://doi.org/10.1155/2015/531352>
- López- Rosales, L., García – Camacho, F., Sánchez – Mirón, A., Martín Beato, E., Chisti, Y. & Molina Grima, E. (2016). Pilot-scale bubble column photobioreactor culture of a marine dinoflagellate microalga illuminated with light emission diodes. *Bioresource Technology*, 216, 845-855. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.06.027>

Merzlyak, M., Chivkunova, O.B., Maslova, I.P., Naqvi, K.R., Solovchenko, A.E. & Yachko-Gurvich, G.L. (2008). Light absorption and scattering by cell suspensions of some cyanobacteria and microalgae. *Russian Plant Physiol.* 55(3), 420-425. <https://doi.org/10.1134/S1021443708030199>

Price, N.M., Thompson, P.A. & Harrison, P.J. (1987). Selenium: an essential element for growth of the coastal marine diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J. Phycol.*, 23, 1-9. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1987.00001.x>

Richmond, A., Hu, Q. (2013). *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology*. Wiley, Oxford.

Roessler, P.G. (1988) Effects of silicon deficiency on lipid composition and metabolism in the diatom *Cyclotella cryptica*. *J. Phycol.* 24(3), 394-400. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1529-8817.1988.tb04482.x>

Sánchez-Saavedra, M.P., Maeda-Martínez, A.N. & Acosta-Galindo, S. (2016). Effect of different light spectra on the growth and biochemical composition of *Tisochrysis lutea*. *J. Applied Phycology*, 28: 839-847. <https://doi.org/10.1007/s10811-015-0656-8>.

Seckbach, J. & Gordon, R., Ed. (2019). *Diatoms: Fundamentals and Applications*. Wiley.

Smayda, T. J. (2011). Cryptic planktonic diatom challenges phytoplankton ecologists. *Proceed. Nat. Acad. Sci.*, 108, 4269-4270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100997108>

Vásquez-Suárez, A., Guevara, M., González, M., Cortez, R. & Arredondo-Vega, B. (2013). Crecimiento y composición bioquímica de *Thalassiosira pseudonana* (Thalassiosirales: Thalassiosiraceae) bajo cultivo semi-continuo en diferentes medios y niveles de irradiancias. *Rev. Biol. Trop.*, 61(3), 1003-1013. https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-77442013000400002&script=sci_arttext

Vásquez-Villalobos, V., Arteaga Gutiérrez, P., Chanamé Acevedo, K. & Esquivel-Torres, A. (2013). Modelamiento matemático y por redes neuronales artificiales del crecimiento de *Spirulina* sp. en fotobiorreactor con fuente de luz fluorescente e iluminación en estado sólido. *Scientia Agropecuaria*, 4, 199 - 209. <https://dx.doi.org/10.17268/sci.agropecuaria.2013.03.06>

Widdle, F. (2010) *Theory and Measurement of Bacterial Growth*. Universitat Bremen, Bremen, Alemania. <https://www.mpi-bremen.de/Binaries/Binary307/Wachstumsversuch.pdf>

Zar, J.H. (2014). *Biostatistical analysis*. 5th Edition. Pearson New International Edition.