

Seguimiento de la dinámica de crecimiento de *Chlorella* sp. en un fotobiorreactor tubular mediante un sistema DAQ y técnicas microbiológicas

Monitoring of the growth dynamics of *Chlorella* sp. in a tubular photobioreactor through a DAQ system and microbiological techniques

José Fernando Aguirre Rojas¹, Jessica Muñoz Negrete¹, Isaac Fernández Villanueva¹, Glenda Edith Cea Barcia¹

¹Departamento de Ciencias Ambientales, DICIVA, CIS, Universidad de Guanajuato
glendacea@ugto.mx¹

Resumen

En el presente trabajo se logró aislar una cepa de microalga nativa proveniente del Lago de Yuriria Guanajuato, con morfología sugerente al género *Chlorella* sp. Se evaluó su crecimiento en distintos medios de cultivo, logrando obtener las mayores concentraciones de biomasa en un Medio Bold rico en nitrógeno (0.75 g NaNO₃/L), utilizando un fotobiorreactor tubular con un sistema de monitoreo en línea de pH, con iluminación y aireación constante, y a temperatura ambiente. Bajo estas condiciones se logró obtener una productividad volumétrica de 65 mgSST/L_{reactor}/d y una concentración final de células de 9.53E+08 ± 2.0E+07 células/mililitro. El sistema de monitoreo en línea de pH permite conocer la dinámica de crecimiento del reactor e identificar los tiempos de operación óptimos, así como la implementación de estrategias de control de pH que puedan permitir incrementar la productividad de biomasa.

Palabras clave: Chlorella; DAQ; Fotobiorreactor; Cepas nativas

Introducción

Las microalgas son microorganismos fotosintéticos pertenecientes al reino de las plantas. Las microalgas son una alternativa ventajosa ante otras tecnologías puesto que son consideradas eco-amigables, ya que reciclan eficientemente contaminantes desde medios líquidos y gaseosos. El cultivo de microalgas presenta cierta superioridad con respecto a otras tecnologías ya que para su producción se pueden usar ciertos recursos que no son adecuados para la agricultura, como aguas salobres, agua marina, y aguas residuales a parte del uso de suelos duros o salinizados, por lo que no compiten con la agricultura respecto a los suelos y el agua. Por otra parte, su alto requerimiento de nutrientes principalmente nitrógeno y fósforo permite su cultivo en aguas residuales aportando el beneficio adicional en la reducción de los contenidos de nitrógeno y fósforo en dichas aguas, anexando que el exceso de estos nutrientes causa eutrofización en los cuerpos de agua la cual es una problemática ambiental considerable. Por otro lado, el crecimiento fotosintético de microalgas es otra forma de bio captura CO₂, ya que fijan el CO₂ en forma de biomasa algal, también son los únicos microorganismos capaces de utilizar altas concentraciones de CO₂ para su crecimiento, y de adaptarse a condiciones extremas de pH, temperatura, salinidad, entre otras, además la biomasa microalgal se puede utilizar en la producción de una gran variedad de productos con valor económico tal como la producción de biocombustible a través de procesos químicos, térmicos y biológicos, la porción lipídica de la biomasa algal se puede emplear en la producción de biodiesel a través del proceso de transesterificación, y digestión anaeróbica para la producción de biogás, como biofertilizante o incluso como fuente de proteína para alimentación animal o humana. Con respecto a las tecnologías disponibles para su cultivo, son diversas las configuraciones de fotobiorreactores utilizadas. Los fotobiorreactores son reservorios específicamente diseñados para cultivar y reproducir organismos fotosintéticos, específicamente para desarrollar microalgas. Dichos reservorios permiten controlar el crecimiento de estos microorganismos mediante la modificación de ciertas variables que permiten incrementar la producción de biomasa o sus bioproductos. Existen varios tipos de fotobiorreactores con distintas características de diseño y ventajas particulares: Fotobiorreactor abierto: Consiste en un reservorio abierto que utiliza luz solar como fuente de energía, son fáciles de operar, simples de fabricar, pero es imposible evitar contaminación y dificulta controlar las variables del medio. Fotobiorreactor cerrado: Al ser un ambiente cerrado, permite mantener un ambiente más limpio, dificultando la contaminación

del medio. Permite regular las concentraciones del medio, optimiza el crecimiento deseado de microalga. Puede ser diseñado con distintas geometrías. Fotobiorreactor tubular: Es un tipo de fotobiorreactor cerrado de forma tubular que puede colocarse de forma horizontal o vertical. Requiere de iluminación artificial y aeración o agitación. Fotobiorreactores planos: Estos sistemas utilizan un tanque plano de poca profundidad que permite el paso de luz para una óptima exposición de las microalgas. Al elegir un tipo de biorreactor se debe tomar en cuenta las variables a analizar, si es o no necesario mantener la inocuidad del medio y la escala del proyecto a realizar. Adicionalmente, los fotobiorreactores se pueden complementar con sistemas de adquisición de datos y monitoreo en línea que permiten optimizar la productividad de biomasa del sistema, entre otras aplicaciones.

El presente trabajo tiene como objetivo aislar una cepa de microalga nativa con potencial para ser utilizada en procesos biotecnológicos, para esto evaluarán técnicas microbiológicas de aislamiento, una vez aislada la cepa, se evaluará su crecimiento y productividad volumétrica en un fotobiorreactor tubular a escala laboratorio con un sistema de monitoreo en línea de pH. Dicho sistema podría ser utilizado como un prototipo preliminar de un proceso de producción a mayor escala de la cepa aislada.

Metodología

Área de trabajo

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Biotecnología Ambiental ubicado en el departamento de Ciencias agrícolas y el laboratorio de Bioprocesos Ambientales ubicado en el departamento de Ciencias Ambientales en la División de Ciencias de la Vida (DICIVA) en el Campus Irapuato-Salamanca Universidad de Guanajuato, ubicada en Ex Hacienda del Copal, Km 9, carretera Irapuato Silao, Irapuato, Guanajuato, México.

Medios de cultivo

Para su crecimiento, todo tipo de microorganismo requiere de una cierta cantidad de nutrientes, los cuales van variando de concentraciones según sus funciones metabólicas. En el caso de las microalgas, al ser organismos fotosintéticos, el medio de cultivo debe contener una fuente de CO₂ y nutrientes como nitrógeno y fosfatos, los cuales se adicionan en el agua. Para la presente investigación se trabajó con medio de cultivo Basal de Bold líquido y sólido, y además se modificó el medio aumentando la concentración de nitrógeno para comparar el crecimiento de las microalgas deseadas en ambos medios.

Medio de cultivo Basal de Bold Líquido

Para el medio de cultivo Basal de Bold (MBB) líquido se utilizaron los reactivos mencionados en la Tabla 1, se prepararon 200 ml de cada una de las primeras seis soluciones respetando las concentraciones indicadas en la tabla ya antes mencionada, para ello se pesaron las cantidades necesarias de cada uno de los reactivos y agregándolas en 200 ml de agua destilada, posteriormente se llevaron a la placa de agitación magnética para disolver el reactivo en el agua destilada y tener cada una de nuestras soluciones.

Tabla 1: Composición del MBB líquido

Compuesto	Cantidad por litro	Concentración de la solución
NaNO ₃	10ml	10g/400ml
CaCL	10ml	1g/400ml
MgSO ₄	10ml	3g/400ml
K ₂ HPO ₄	10ml	3g/400ml
KH ₂ PO ₄	10ml	7g/400ml

NaCl	10ml	1g/400ml
EDTA Stock	1 gota (0.05 mL)	50g/1000ml EDTA 31 g/1000ml KOH
Iron Stock	1 gota (0.05 mL)	10ml/1000ml H ₂ SO ₄ 5g/1000ml FeSO ₄
Boron Stock	1 gota (0.05 mL)	11g/1000ml H ₃ BO ₃
Bold Trace Stock	1 gota (0.05 mL)	8.82g/1000ml ZnSO ₄ . 1.44g/1000ml 7H ₂ O 0.71g/1000ml MnCl ₂ .4H ₂ O, 1.57g/1000ml MoO ₃ , 0.49g/1000ml CuSO ₄ .SH ₂ O, Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O

Una vez preparadas las soluciones necesarias para el medio de cultivo, se añadieron 5ml de cada una a un matraz aforado de 500 ml con una pipeta de 10ml y 0.025 ml de los micronutrientes con una micropipeta y se aforó a 500 ml. El MBB se agregó en un matraz Erlenmeyer de 1000ml y se llevó a la autoclave donde permaneció por 15 minutos después de alcanzar la presión de 15 psi, junto con el MBB se llevó a la autoclave dos matraces Erlenmeyer de 500ml los cuales se utilizaron para agregar 250ml de MBB en cada uno de ellos dentro de la campana microbiológica y posteriormente se inoculó por duplicado la muestra inicial.

Medio de cultivo Basal de Bold Sólido

La preparación del medio de cultivo Basal de Bold sólido se realizó con metodología utilizada para el MBB líquido, agregando 15g por litro de agar bacteriológico como se muestra en la Tabla 2 y se llevó a la placa de agitación magnética para que se pudiera disolver en la solución antes de llevarlo a la autoclave. Al término del tiempo dentro de la autoclave se llevó a la campana microbiológica donde posteriormente se agregó a 10 cajas de Petri las cuales fueron esterilizadas junto con el medio de cultivo.

Tabla 2: Composición del MBB sólido

Compuesto	Cantidad por litro	Concentración de la solución
NaNO₃	10ml	10g/400ml
CaCL	10ml	1g/400ml
MgSO₄	10ml	3g/400ml
K₂HPO₄	10ml	3g/400ml
KH₂PO₄	10ml	7g/400ml
NaCl	10ml	1g/400ml
EDTA Stock	1 gota (0.05 mL)	50g/1000ml EDTA 31 g/1000ml KOH
Iron Stock	1 gota (0.05 mL)	10ml/1000ml H ₂ SO ₄ 5g/1000ml FeSO ₄
Boron Stock	1 gota (0.05 mL)	11g/1000ml H ₃ BO ₃
Bold Trace Stock	1 gota (0.05 mL)	8.82g/1000ml ZnSO ₄ . 1.44g/1000ml 7H ₂ O

		0.71g/1000ml MnCl ₂ .4H ₂ O,
		1.57g/1000ml MoO ₃ ,
		0.49g/1000ml CuSO ₄ .SH ₂ O, Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O
Agar	15g	

Las cajas de Petri se dejaron en la campana microbiológica durante una hora aproximadamente hasta que pasaron de estado líquido a estado sólido, posteriormente se llevaron a la incubadora donde se dejaron por 24 horas antes de inocular, esto con la finalidad de identificar si el MBB sólido presentó algún tipo de contaminación o está listo para poder inocular.

Medio de cultivo Basal de Bold Modificado

Se realizó un tercer medio de cultivo Basal de Bold utilizando a la misma metodología que los anteriores, pero ahora agregando 30 ml de fuente de nitrógeno como se muestra en la Tabla 3 con la finalidad de observar la diferencia del crecimiento de las algas en los dos medios, al mirar el crecimiento que presentó el medio modificado se tomó para realizar la cinética en el fotobiorreactor.

Tabla 3: Composición del MBB modificado

Compuesto	Cantidad por litro	Concentración de la solución
NaNO₃	30ml	10g/400ml
CaCL	10ml	1g/400ml
MgSO₄	10ml	3g/400ml
K₂HPO₄	10ml	3g/400ml
KH₂PO₄	10ml	7g/400ml
NaCl	10ml	1g/400ml
EDTA Stock	1 gota (0.05 mL)	50g/1000ml EDTA 31 g/1000ml KOH
Iron Stock	1 gota (0.05 mL)	10ml/1000ml H ₂ SO ₄ 5g/1000ml FeSO ₄
Boron Stock	1 gota (0.05 mL)	11g/1000ml H ₃ BO ₃
Bold Trace Stock	1 gota (0.05 mL)	8.82g/1000ml ZnSO ₄ . 1.44g/1000ml 7H ₂ O 0.71g/1000ml MnCl ₂ .4H ₂ O, 1.57g/1000ml MoO ₃ , 0.49g/1000ml CuSO ₄ .SH ₂ O, Co(NO ₃) ₂ .6H ₂ O

Aislamiento de microalgas nativa

Las microalgas son las más adecuadas para la fijación del CO₂ en gases de combustión porque son los únicos organismos capaces de adaptarse a ambientes cambiantes de condiciones climáticas (temperatura, pH, salinidad, etc.) pudiendo incluso soportar condiciones extremas y de utilizar altas concentraciones de CO₂.

En la presente investigación se buscó aislar la microalga del género *Chlorella sp*, para esto se realizaron resiembras en repetidas ocasiones en medio de cultivo Basal de Bold en líquido y sólidos agregando Agar Bacteriológico, además se realizó un medio de cultivo Basal de Bold modificado en estado líquido, se realizaron diluciones seriadas de la muestra inicial obtenidas la Laguna de Yuriria ubicada en el municipio de Yuriria, Guanajuato, México, con la finalidad de tener una menor concentración de crecimiento de colonias de microalgas y a su vez una mayor identificación de la microalga deseada.

Para el MBB líquido se realizó la inoculación por duplicado utilizando 5ml de la muestra inicial los cuales se agregaron al matraz que contenía 250ml del medio, la inoculación se llevó a cabo en la campana microbiológica utilizando una micropipeta, puntas que fueron esterilizadas anteriormente y un mechero, al término de la inoculación se llevaron los dos matraces a un área donde se contaba con lámparas led las cuales tiene una luminosidad de 10W para tener un mayor crecimiento de microalgas.

Para el MBB sólido se realizó la resiembra dentro de la campana microbiológica con el método de dispersión y método de agotamiento, para realizar ambos métodos se realizaron tres diluciones seriadas tomadas de la muestra inicial, para la siembra se utilizó un asa bacteriológica y un mechero para mantener el área estéril y evitar una contaminación.

La inoculación del medio de cultivo Basal de Bold se realizó utilizando la misma metodología para el MBB, agregando el 10% del inóculo de la cantidad de medio que se agregó al matraz en este caso 250ml, para ello se realizó la inoculación por duplicado.

Unidades Experimentales

A lo largo de este verano de investigación se lanzaron 1 cultivo y 3 cinéticas con iluminación constante y condiciones estándar. El cultivo 1 se llevó a cabo en MBB sólido. En la primera cinética se utilizó un medio Bold sin agar para crecimiento en líquido. Para la segunda cinética se continuó usando el medio utilizado para la cinética 2. Para la tercera cinética se utilizó MBB modificado.

Fotobiorreactor y sistema DAQ

Durante la investigación se evaluó el crecimiento de microalgas en un fotobiorreactor de tipo tubular vertical cristalino de 0.39 m de altura por 0.06 m de diámetro interior, con una capacidad de 1.1 L, como lo muestra la Figura 1.

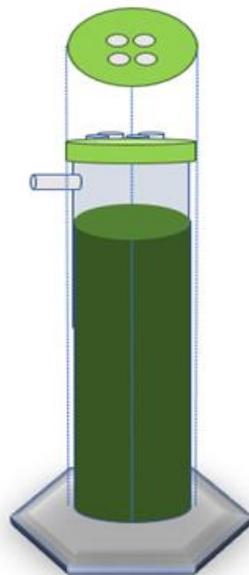


Figura 1. Diseño de fotobiorreactor tubular

El fotobiorreactor evaluado presenta también 4 orificios en la parte superior los cuales tienen como finalidad ser utilizados para entradas para la medición y control de los parámetros: el primer orificio es para medir el pH ya que se le introduce la sonda de pH para monitorearlo en tiempo real, el segundo orificio es usado para agregar el ácido clorhídrico 1 N con el fin de regular entre 7-8.5 el pH del medio, el tercer orificio es utilizado para la entrada de la manguera que conduce la aireación al cultivo, y el cuarto orificio es usado para la toma de muestra del cultivo, como se muestra en la Figura. 2.

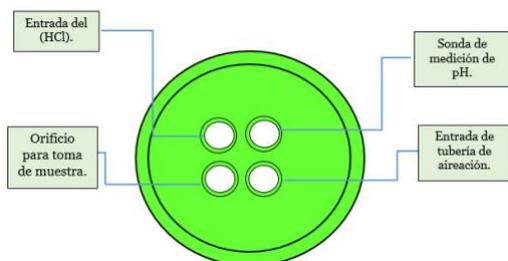


Figura 1. Descripción de los orificios en la tapa del fotobiorreactor

En la Figura 3, se muestran los componentes del sistema evaluado a través de un fotobiorreactor transparente, que cuenta con una sonda de pH la cual indica a través de una computadora el pH actual del cultivo, también se sitúan seis lámparas LED para el suministro de luz, para adicionar burbujeo y liberación de oxígeno del medio se usó una bomba de aire. El fotobiorreactor fue operado en modalidad por lotes.



Figura 2. Ubicación de los componentes del diseño experimental

Adicionalmente, el fotobiorreactor cuenta con un sistema automatizado de medición de pH en tiempo real, compuesto por una sonda de pH (Atlas Scientific). El sistema de monitoreo en línea y de adquisición de datos consta de un ambiente de desarrollo científico Scilab instalado en una computadora y de un microcontrolador Arduino para leer la sonda de pH.

Determinación de Sólidos Suspendedos Totales

En la investigación se realizó la determinación de sólidos suspendidos totales existente en el reactor después de un periodo de 9 días, para la cual tomamos una muestra de 30ml según la NMX-AA-034-SCFI-2015. Para realizar la medición de sólidos se utilizó el método de sólidos suspendidos por gravimetría con un filtro de fibra de vidrio de 1.2 micrómetros. Después de filtrar la muestra, el filtro con los sólidos se llevó a la estufa de secado a 100°C durante 12 horas, al pasar el periodo de tiempo ya antes mencionado se tomó el peso del filtro con la biomasa para posteriormente realizar el calculo y obtener la cantidad de biomasa existente.

Determinación de concentración de células

Se determino la concentración de células por mililitro, para ello se tomó una muestra del fotobiorreactor, el método utilizado para la determinación de las células fue conteo por cámara Neubauer, se realizó el método por triplicado para tener resultados representativos. Con la finalidad de facilitar la determinación del conteo de las células, se utilizó un factor de dilución de 50, las diluciones se realizaron dentro de la campana microbiológica utilizando una micropipeta y puntas estériles. Las diluciones se llevaron a un agitador vortex para posteriormente agregar 10 microlitros en una cámara Neubauer con una micropipeta de 10 microlitros, se observaron las muestras en el microscopio y se procedió a realizar el conteo.

Resultados y discusiones

Aislamiento de microalga nativa

A continuación se presenta la interpretación de resultados obtenidos durante el verano de investigación. Como fue antes mencionado, para efecto de este proyecto se utilizaron como inóculo microalgas obtenidas en el lago de Yuriria, siguiendo un protocolo para evitar contaminación del mismo con otros microorganismos.

Tras haber preparado los medios de cultivo MBB líquidos, fueron introducidos al autoclave en matraces para garantizar su esterilidad antes de ser inoculados con las microalgas y posteriormente se colocaron bajo iluminación a temperatura ambiente. Debido al periodo de reactivación de las microalgas, se utilizaron dos inóculos activos como control para verificar que el MBB permitiera un desarrollo óptimo para los microorganismos. A su vez, el MBB sólido estéril fue depositado en cajas Petri al salir del autoclave para ser incubado durante un periodo de 24 horas, para desechar cualquier caja Petri que haya sido contaminada con otros microorganismos. Pasadas esas 24 horas, si carecen de crecimiento pueden ser usadas para inocular las microalgas.

Se utilizaron dos métodos de inoculación en sólido, dispersión y agotamiento para aislar las microalgas. En el caso del método de dispersión se realizaron tres diluciones seriadas y se inocularon las últimas dos por duplicado utilizando 1ml de dichas diluciones para cada caja Petri. Para el método de agotamiento se tomó una muestra con asa bacteriológica del inóculo y se introdujo en las cajas Petri por duplicado.

Ambos medios, MBBi y MBBs estuvieron en las mismas condiciones, iluminación con luces led y temperatura ambiente. Y fueron mantenidas en observación durante una semana para observar el crecimiento de las microalgas. El crecimiento del medio MBBi en los matraces de control es considerable para haber permanecido sin aireación ni agitación. Debido a una alta concentración de células se llevaron a cabo diluciones seriadas del medio para tener colonias aisladas. Como se observa en las Figuras 4 y 5, el método de dispersión presentó un mayor crecimiento que la técnica de agotamiento.



Figura 4. Método de aislamiento por dispersión



Figura 5. Método de aislamiento por agotamiento

Posteriormente, se tomaron muestras de las cajas Petri y fueron analizadas al microscopio (Primostar) con un aumento de 40x. Se pueden observar varios tipos de microalgas de morfología cocoide, sugestiva al género clorofita *Chlorella* sp. (Figura 6).

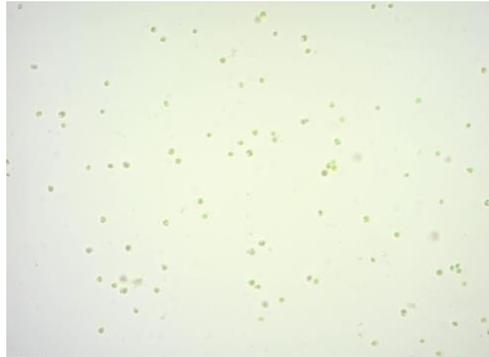


Figura 6. Inóculo con microalgas del género *Chlorella* sp.

Se analizaron al microscopio diversos inóculos en busca de uno con la menor cantidad de colonias mezcladas, seleccionando el inóculo con un contenido dominante de microalgas del género *Chlorella* sp. (no axénico).

Posteriormente, se preparó medio tanto MBB1 como MBBs para inocular con el inóculo seleccionado, repitiendo el proceso para garantizar la esterilidad. Tras inocular, ambos MBB fueron puestos en bajo 2000 lux a temperatura ambiente durante una semana para observar el crecimiento.



Figura 7. Matraces con *Chlorella* sp. al 5% y 10% (v/v) de inóculo

Cultivo de *Chlorella* sp en un fotobiorreactor tubular y monitoreo en línea

Para realizar las cinéticas de crecimiento en el fotobiorreactor tubular, se seleccionó como inóculo el cultivo líquido con mayor concentración de las microalgas aisladas. En esta etapa se utilizó MBBm para el crecimiento de *Chlorella* sp con el fin de aumentar la concentración final de células, además de aireación continua (aireación estéril) y 2000 lux de intensidad lumínica. Adicionalmente, se realizó el monitoreo en línea del pH durante el cultivo, con el fin de determinar el perfil de crecimiento de la cepa en tiempo real.



Figura 8. Fotobiorreactor inoculado con *Chlorella* sp. en medio MBB modificado.

Pasado un día de cultivo, el cultivo mostró un crecimiento mucho mayor al visto anteriormente. Además, el pH aumentó, debido a que la fotosíntesis altera el equilibrio químico del CO_2 en agua. La existencia de este equilibrio provoca que durante la fijación fotosintética de CO_2 , se acumule OH^- en el medio de cultivo, subiendo el pH.

El fotobiorreactor fue monitoreado durante 9 días (Figura 9). Alrededor del quinto día, el fotobiorreactor alcanzó un pH de 10 con un visible aumento de la concentración de células. A este pH las microalgas entran en un periodo estacionario, ya que a pHs sobre 9, el CO_2 ya no se encuentra disponible, siendo el CO_3^{2-} (carbonato) la especie predominante, el cual no es consumido por las microalgas clorofitas. Al séptimo día se adiciona un pulso de ácido clorhídrico 1 N, bajando el pH del medio a 8, fomentando así el crecimiento de las microalgas (Figura 9). Al noveno día ya no se observó crecimiento celular (estado estacionario), lo cual es un indicador de que alguno de los nutrientes disponibles en el medio se consumió por completo (nutriente limitante).

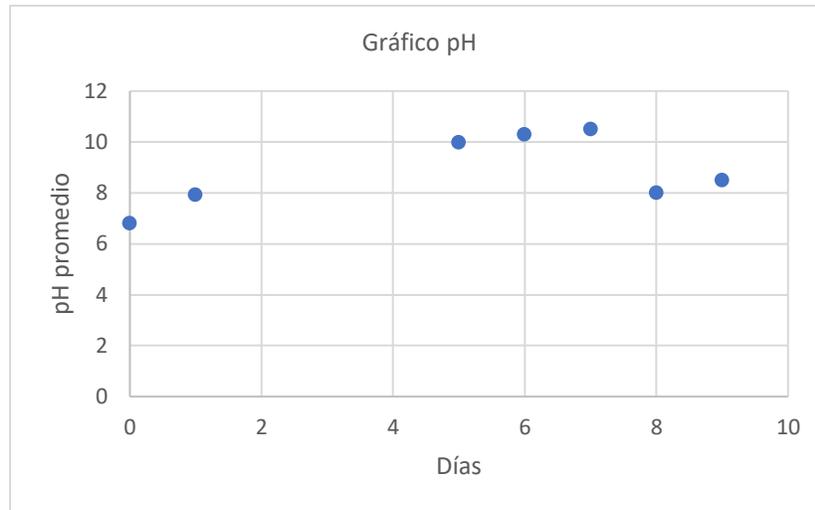


Figura 9. Seguimiento en línea del pH. Cada punto corresponde al promedio de los datos capturados cada día.



Figura 10. Día 9 del fotobiorreactor

En el noveno día se determinó la concentración final de Sólidos Suspendedos Totales como un indicador de la concentración final de biomasa, obteniendo un valor de 583.3 mgSST/L. También se determinó la concentración final de células por mililitro, obteniendo un valor de $9.53E+08 \pm 2.0E+07$ células/mililitro. Estos resultados confirman que con el sistema evaluado se logró alcanzar una elevada concentración celular en un bajo periodo de tiempo, lo cual es equivalente a una productividad volumétrica de 65 mgSST/L_{reactor/d}.

Conclusiones

El presente trabajo demuestra que es factible aislar cepas nativas de clorofitas con potencial para ser utilizadas en bioprocesos ambientales y biotecnología. La elevada productividad de biomasa obtenida con la cepa aislada evidencia que es viable su utilización como biomasa valorizable en sistemas productivos sostenibles como producción de proteínas para alimento animal y humano, procesos de captación de CO₂,

producción de biofertilizantes y producción de biocombustibles. Adicionalmente, los sistemas de monitoreo en línea permiten conocer el estado del fotobiorreactor en tiempo real, lo cual es una herramienta para la recopilación y análisis de datos, detección de fallas y el desarrollo de estrategias de optimización de bioprocesos.

Bibliografía/Referencias

- (1) G. Cea-Barcia, F. López-Caamal, I. Torres-Zúñiga, H. Hernández-Escoto, "Biogas Purification Via Optimal Microalgae Growth: A Literature Review", *Biotechnol Progress*, 2018, Vol. 34, No. 6, pp, 1513-1532.
- (2) Barh M, Díaz I, Domínguez A, González Sánchez A, Munoz R. Microalgal-Biotechnology as a platform for an integral biogas upgrading and nutrient removal from anaerobic effluents. *Environ Sci Technol*. 2013; 48:573–581.
- (3) De Moraes, MG, da Silva, CK, Henrard, AA y Costa, JAV (2015). Mitigación de dióxido de carbono por microalga en un reactor tubular vertical con reciclaje del medio de cultivo. *Revista Africana de Investigación en Microbiología*, 9 (33), pp 1935-1940.
- (4) Hernández-Pérez, A., & Labbé, J. I. (2014). Microalgas, cultivo y beneficios. *Revista de Biología Marina Y Oceanografía*, 49(2), 157–173. <https://doi.org/10.4067/s0718-19572014000200001>