



**UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO**

**FACULTAD DE INGENIERÍA**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA  
AMBIENTAL**

**“Evaluación del contenido lipídico de la microalga *Tetraselmis contracta*  
ante diferentes concentraciones de nitrato como nutriente, para su  
potencial uso como biodiesel, 2018”**

**TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERA AMBIENTAL**

**AUTOR(A):**

**ANGIE ELIZABETH ALLENDE USAQUI**

**ASESOR:**

**Mg. Ing. JUAN ALBERTO PERALTA MEDINA**

**LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:**

**CALIDAD Y GESTIÓN DE LOS RECURSOS NATURALES**

**LIMA - PERÚ**

**2018**

---

PRESIDENTE

Dr. Carlos Cabrera Carranza

---

SECRETARIO

Dr. Elmer Benites Alfaro

---

VOCAL

Mg. Juan Peralta Medina

**Dedicatoria**

Esta investigación está dedicada de manera especial al autor de la creación de todas las cosas majestuosas, Jehová.

## **Agradecimiento**

En primer lugar a Jehová por darme conocimiento, sabiduría e inteligencia.

A mis padres Hubert Allende e Hilda Usaqui y mi hermana Kathya por ser parte fundamental en el trayecto de mi formación personal y profesional.

Al Ing. Manuel Figueroa por darme la facilidad de practicar en el laboratorio de cultivo menores de la UNFV, y aprender las buenas prácticas para el cultivo de microalgas.

A Hanna Hernandez – Bióloga marina - por ofrecerme su apoyo constante frente a cualquier duda en todo el proceso de mi investigación

Al químico Leenin Flores, por compartir su conocimiento enseñándome con paciencia los procedimientos claves para el término de mi investigación.

A mi centro de prácticas - CMIT INGENIEROS S.A.C - por darme la facilidad de tiempo para concluir satisfactoriamente mi tesis.

## DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD

Yo Angie Elizabeth Allende Usaqui con DNI N° 70982613 , a efecto de cumplir con las disposiciones vigentes consideradas en el Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela de Ingeniería ambiental, declaro bajo juramento que toda la documentación que acompaño es veraz y auténtica.

Así mismo, declaro también bajo juramento que todos los datos e información que se presenta en la presente tesis son auténticos y veraces.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas de la Universidad César Vallejo.

Lima, ..... del .....

---

Angie Elizabeth Allende Usaqui

## PRESENTACIÓN

Señores miembros del jurado:

En cumplimiento del Reglamento de Grados y Títulos de la Universidad César Vallejo presento antes ustedes la tesis titulada “Evaluación de la productividad lipídica de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo diferentes concentraciones de nitrato, a nivel de laboratorio, para su potencial uso como biocombustible”, la misma que someto a vuestra consideración y espero que cumpla con los requisitos de aprobación para obtener el título Profesional de Ingeniera Ambiental.

## ÍNDICE

Dedicatoria .....	III
Agradecimiento .....	IV
DECLARACIÓN DE AUTENTICIDAD .....	V
PRESENTACIÓN .....	VI
RESUMEN .....	XIII
SUMMARY .....	XIV
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Realidad problemática .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Trabajos previos .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 Teorías relacionadas al tema .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1 Biocombustible .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.1 Biocombustible de primera generación: .....</b>	<b>7</b>
<b>1.3.1.2 Biocombustible de segunda generación: .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.1.3 Biocombustible de tercera generación: .....</b>	<b>8</b>
<b>1.3.2 Microalga .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.2.1 Tetraselmis contracta .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.3 Crecimiento de la microalga .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3.1 Fase de latencia o adaptación .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3.2 Fase exponencial .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3.3 Fase de desaceleración .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3.4 Fase estacionaria .....</b>	<b>11</b>
<b>1.3.3.5 Fase de muerte .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.4 Medio de cultivo .....</b>	<b>12</b>
<b>1.3.4.1 Medio Guillard f/2 .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.5 Nutrientes principales .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.5.1 Carbono .....</b>	<b>13</b>
<b>1.3.5.2 Nitrógeno .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.5.3 Fósforo .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.6 Parámetros medioambientales .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.6.1 Salinidad .....</b>	<b>14</b>
<b>1.3.6.2 Luminosidad .....</b>	<b>15</b>
<b>1.3.6.3 Temperatura .....</b>	<b>15</b>

1.3.6.4	pH.....	15
1.3.6.5	Aireación / agitación .....	15
1.3.7	Composición de la microalga .....	15
1.3.7.1	Lípidos en la microalga.....	16
1.3.8	Extracción de lípidos .....	16
1.3.8.1	Método Folch .....	16
1.3.9	Estimación de la producción de biodiesel.....	16
1.3.9.1	Biodiesel .....	16
1.3.9.2	Determinación del rendimiento.....	17
1.4	Formulación del problema.....	17
1.4.1	Problema general.....	17
1.4.2	Problemas específicos .....	17
1.5	Justificación del estudio.....	18
1.6	Hipótesis .....	19
1.6.1	Hipótesis general .....	19
1.6.2	Hipótesis específicos .....	19
1.7	Objetivos .....	19
1.7.1	Objetivo general.....	19
1.7.2	Objetivos específicos .....	19
II.	MÉTODOS.....	20
2.1	Diseño de investigación .....	20
2.1.1	Procedimiento .....	22
2.1.1.1	Proceso de lavado y esterilización .....	22
2.1.1.2	Preparación del medio de cultivo .....	22
2.1.1.3	Conteo celular .....	23
2.1.1.4	Determinación del contenido de lípidos.....	25
2.2	Variables .....	29
2.2.1	Variable independiente.....	29
2.2.2	Variable dependiente.....	29
2.3	Población y muestra .....	30
2.3.1	Población.....	30
2.3.2	Muestra .....	30



<b>2.4</b>	<b>Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.....</b>	<b>30</b>
2.4.1	Técnica.....	30
2.4.2	Instrumento .....	30
2.4.3	Validez.....	31
2.4.4	Confiabilidad .....	31
<b>2.5</b>	<b>Métodos de análisis de datos.....</b>	<b>31</b>
<b>2.6</b>	<b>Aspectos éticos .....</b>	<b>31</b>
<b>III.</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>Análisis descriptivo.....</b>	<b>32</b>
3.1.1	Curva de crecimiento y densidad celular .....	32
3.1.2	Contenido de lípidos por volumen de cultivo .....	37
3.1.3	Contenido lipídico celular (pg/cel) .....	38
3.1.4	Estimación de la producción de biodiesel.....	39
<b>3.2</b>	<b>Análisis inferencial.....</b>	<b>40</b>
3.2.1	Densidad celular .....	40
3.2.2	Concentración de lípidos .....	42
3.2.3	Contenido lipídico celular (pg/cel) .....	45
<b>IV.</b>	<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>48</b>
<b>V.</b>	<b>CONCLUSION.....</b>	<b>49</b>
<b>VI.</b>	<b>RECOMENDACIÓN .....</b>	<b>50</b>
<b>VII.</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>.....</b>	<b>56</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura N° 1. Microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo microscopía óptica .....	10
Figura N° 2. Curva y fases de crecimiento de las microalgas .....	12
Figura N° 3. Esterilización de materiales. Fuente: Elaboración propia .....	22
Figura N° 4. Preparación y distribución de los medios de cultivo .....	23
Figura N° 5. Inoculación y rotulado de los cultivos .....	23
Figura N° 6. Extracción de una alícuota para el conteo celular .....	24
Figura N° 7. Conteo celular .....	24
Figura N° 8. Centrifugación y formación de pellets .....	25
Figura N° 9. Preparación de la mezcla Cloroformo: metanol (2:1) .....	26
Figura N° 10. Separación de los lípidos de la biomasa .....	27
Figura N° 11. Preparación de la mezcla: agua ultra pura y KCl .....	27
Figura N° 12. Separación de fases Cloroformo: metanol .....	28
Figura N° 13. Secado con evaporador/concentrador y estufa de vacío .....	28
Figura N° 14. Contenido de lípidos totales en el vial .....	29
Figura N° 15. Estadío de vida predominante en la réplica E2 .....	35
Figura N° 16. Microalga <i>Tetraselmis contracta</i> fijada con lugol – enfoque 40x. ...	36

## ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica N° 1. Curva de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo una concentración de 0 mM de nitrato (NaNO <sub>3</sub> ).....	32
Gráfica N° 2. Curva de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo una concentración de 0.88 mM de nitrato (NaNO <sub>3</sub> ).....	33
Gráfica N° 3. Curva de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo una concentración de 1.76 mM de nitrato (NaNO <sub>3</sub> ).....	34
Gráfica N° 4. Curva de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo una concentración de 2.65 mM de nitrato (NaNO <sub>3</sub> ).....	34
Gráfica N° 5. Curva de crecimiento de la microalga <i>Tetraselmis contracta</i> bajo una concentración de 3.53 mM de nitrato (NaNO <sub>3</sub> ).....	35
Gráfica N° 6. Prueba de normalidad de residuos–Densidad celular (cel/ml) .....	40
Gráfica N° 7. Gráfica de Concentración de nitrato vs. Densidad celular .....	41
Gráfica N° 9. Método MCB de Hsu - Densidad celular.....	42
Gráfica N° 10. Prueba de normalidad de residuos – Concentración de lípidos (µg/ml) .....	43
Gráfica N° 11. Gráfica de concentración de nitrato (mM) vs. Concentración de lípidos (µg/ml).....	44
Gráfica N° 12. Comparación por el método de Tukey – Concentración de lípidos (µg/ml) .....	44
Gráfica N° 13. Método MCB de Hsu - Concentración de lípidos .....	45
Gráfica N° 14. Prueba de normalidad de residuo – contenido lipídico celular (pg/cel) .....	45
Gráfica N° 15. Concentración de nitratos (mM) vs. Contenido lipídico celular (pg/cel) .....	46
Gráfica N° 16. Comparación por el método de Tukey – Contenido lipídico celular (µg/ml) .....	47
Gráfica N° 17. Método MCB de Hsu – Contenido lipídico celular (pg/cel) .....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla N° 1. Comparación de algunas fuentes de biodiesel.....	9
Tabla N° 2. Taxonomía de la <i>Tetraselmis contracta</i> .....	11
Tabla N° 3. Composición de Medio Guillard f/2.....	13
Tabla N° 4. Rendimiento del biodiesel .....	17
Tabla N° 5. Niveles del factor de investigación .....	20
Tabla N° 6. Tratamientos del diseño experimental.....	21
Tabla N° 7. Matriz de operacionalización .....	29
Tabla N° 8. Densidad celular en el último día de cultivo .....	36
Tabla N° 9. Concentración de lípidos (mg/L).....	37
Tabla N° 10. Contenido lipídico celular .....	38
Tabla N° 11. Estimación de la producción de diesel .....	39
Tabla N° 12. Análisis de varianza – Densidad celular (cel/ml) .....	40
Tabla N° 13. Análisis de varianza – Concentración de lípidos (µg/ml) .....	43
Tabla N° 14. Análisis de varianza – Contenido lipídico celular.....	46

## RESUMEN

En la presente investigación se estudiaron los efectos de la concentración de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), en el contenido lipídico (pg/cel) de la microalga *Tetraselmis contracta*, determinando primero la densidad celular (cel/ml) y la concentración de lípidos (mg/L), como un parámetro importante de viabilidad para la producción de biodiesel. En el estudio se evaluaron 5 niveles de concentración de nitrato (0, 0.88, 1.76, 2.65 y 3.53 mM), tomando como referencia el medio de cultivo Guillard (f/2), preparada a un volumen de 100ml y añadiéndole 10ml de la cepa *T. contracta* a una temperatura aproximada de 18°C , pH neutro y una intensidad lumínica de 1500lux. La densidad celular se determinó por el conteo diario en la cámara de Neubaur y el ensayo de lípidos se realizó bajo el método de Folch modificado por el Instituto del Mar Peruano (IMARPE), obteniendo que la mayor densidad celular (cel/ml) de la microalga *Tetraselmis contracta* se obtuvo en un medio de cultivo a concentración de 1.76 mM y 3.53 mM, el mayor contenido de lípidos por volumen de cultivo ( $\mu\text{g/ml}$ ) a una concentración de 3.53 mM y 1.76 mM y el mayor contenido lipídico celular (pg/cel) a una concentración de 3.53 mM y 0 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ).

**PALABRAS CLAVES:** Microalga, nitratos, densidad celular, lípidos, biodiesel.

## SUMMARY

In the present investigation the effects of nitrate concentration ( $\text{NaNO}_3$ ) on the lipid content ( $\text{pg/cel}$ ) of the microalga *Tetraselmis contracta* were studied, determining first the cell density ( $\text{cel/ml}$ ) and the concentration of lipids ( $\text{mg / L}$ ), as an important parameter of viability for the production of biodiesel. In the study, 5 levels of nitrate concentration (0, 0.88, 1.76, 2.65 and 3.53 mM) were evaluated, taking as reference the Guillard culture medium (f/2), taking as a volume of 100ml of culture medium with 10ml of the *T. contracta* strain at a temperature of approximately 18 ° C and a luminous intensity of 1500 lux. The cell density was determined by the daily count in the Neubaur chamber and the lipid assay was performed under the Folch method modified by Institute of the Peruvian Sea (IMARPE), obtaining that the highest cell density ( $\text{cel / ml}$ ) of the microalgae *Tetraselmis contracta* was obtained at a concentration of 1.76mM, the highest lipid content per culture volume ( $\mu\text{g/ml}$ ) at a concentration of 3.53mM and the highest cellular lipid content ( $\text{pg/cel}$ ) at a concentration of 3.53mM and 0mM of nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ).

KEY WORDS: Microalga, nitrates, cell density, lipids, biodiesel

## I. INTRODUCCIÓN

### 1.1 Realidad problemática

La escasez de recursos y la contaminación ambiental son unos de los desafíos críticos en la actualidad, por su gran repercusión social económica y ambiental. Sobre este enfoque un análisis retrospectivo en el tiempo nos indica que los problemas relacionados a la utilización de recursos no renovables como fuente de energía y su inherente impacto ambiental yacen desde la revolución industrial, a partir de entonces en el transcurso del tiempo la sociedad se volvió dependiente de las reservas de los recursos fósiles, como fuente de energía, combustible, productos químicos, etc.

En la actualidad, alrededor del 90% de la energía se genera a partir de combustibles fósiles y solo el 10% se produce de fuentes de energía renovables, esta utilización desmesurada de combustible fósiles ha generado el aumento de las concentraciones de gases de efecto invernadero a un ritmo sin precedentes, alcanzando los niveles más altos desde la existencia del ser humano, contribuyendo al calentamiento global y en consecuencia el cambio climático, que económicamente fue etiquetado como la mayor falla de mercado que el mundo haya visto una vez, por el economista Baron Nicholas Stern en el Stern Review, resaltando la importancia de implementar acciones de mitigación.

El preocupante estado actual hace necesario el desarrollo de energías alternativas, tomando por ello mayor importancia los biocombustibles, una no tan nueva alternativa para reducir estos impactos negativos, sin embargo la proyección que ha tenido los biocombustibles han estado basados en materia prima que forman parte de los productos alimenticios como el maíz, cáñamo, soja, palma, etc., implicando también el uso de grandes áreas de terreno.

El grupo de biocombustibles de tercera generación a comparación de las otras generaciones no compiten con productos alimenticios teniendo por

ello mejores ventanas, este grupo tiene como materia prima a los microorganismos obteniéndose en ellas mejores resultados, considerando en especial a las microalgas como el futuro diesel verde, puesto que podrían ofrecer gran parte de las soluciones por sus diversos beneficios, como su mayor eficiencia fotosintética, logrando convertir entre el 3 y 8% de la energía solar en biomasa mientras que el rendimiento en las plantas es de aproximadamente 0.5% (Lardon *et al.*, 2009), un gran potencial para la mayor producción de biomasa que cualquier otra planta oleaginosa (Mata *et al.*, 2010) y no necesitar grandes espacios de terreno para su producción, sin embargo hasta la fecha no es considerado económicamente viable, y lo que se pretende en esta investigación es buscar el enfoque de la eficiencia de la concentración de lípidos alterando las concentraciones de nitrato y buscar el tratamiento con mejores resultados para la microalga *Tetraselmis contracta*.

## **1.2 Trabajos previos**

(Wan, 2013) Esta tesis presenta una revisión de los diferentes cultivos, métodos y técnicas de conversión de energía de microalgas, haciendo una comparación con las biomásas de otras materias primas.

Estudió el proceso de producción de energía de microalgas, que incluye la recolección, la extracción de aceite y su conversión a energía, también la revisión del ACV (Análisis de ciclo de vida) respecto a la producción de microalgas, concluyendo que las microalgas tienen una gran posibilidad de reemplazar el combustible fósil en el futuro cercano.

(Cobos, Paredes y Castro, 2016) En el artículo de investigación titulado; "Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo", se evaluaron la concentración de lípidos totales en cinco especies de microalgas – *Ankistrodesmus* sp., *Ankistrodesmus nanoselene*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus quadricauda*- en un medio de estrés nutritivo y en un medio con nutriente. Para este estudio utilizaron el medio CHU 10 como referencia para su medio de cultivo, modificando solo el contenido de nitrógeno. concluyendo que la *Ankistrodesmus* sp, mostró



la mayor tasa de crecimiento (0,77 día<sup>-1</sup>), *Scenedesmus quadricauda* la mayor producción de biomasa ( 174,7 mg/l) y *Ankistrodesmus nanoselene* el mayor porcentaje de lípidos ( 316 mg/g biomada seca en condiciones de cultivo sin nitrógeno).

(Paliwal, *et al.*, 2017) Esta revisión se enfoca principalmente en cambios en el nivel celular bajo condiciones de estrés y sus correspondientes efectos sobre los lípidos, pigmentos y polímeros. Las especies de microalgas responden a las condiciones ambientales cambiantes (factores de estrés abióticos) modulando sus metabolitos. Se encuentra que la limitación del nitrógeno y el estrés por salinidad son condición de estrés más ampliamente aplicada para la producción comercial de materia prima para biodiesel.

(Shin, *et al.*, 2018) El biocombustible Microalgal ha iniciado una nueva generación de sistemas de biocombustibles sin aumentar la presión sobre el debate "comida versus combustible" ni perturbar el ecosistema forestal. Sin embargo, para fecha, el biocombustible microalgal no ha ganado su viabilidad económica. Para el éxito de la industria, los productos dirigidos deben tener un alto rendimiento y productos finales estables. Esta revisión sugiere estrategias para aumentar la viabilidad económica general de la producción de lípidos. En un bioproceso de microalgas, la cepa con características deseables es esencial para disminuir el costo total de la producción de biodiesel. Además, varios factores fisicoquímicos tales como la luz, la temperatura, el pH, la concentración de CO<sub>2</sub> y la inanición de nutrientes afectan al productividad de lípidos y la composición de ácidos grasos.

(Converti, *et al.*, 2009) En esta investigación se estudiaron los efectos de la temperatura y la concentración de nitrógeno en el contenido de lípidos de dos microalgas, *Nannchloropsis oculata* y *Chlorella vulgaris*, siendo su principal interés la influencia de la concentración de nitrato, observando un aumento de 7.90 a 15.31% y de 5.90 a 16.41% del contenido lipídico de

las dos microalgas respectivamente cuando se redujo la concentración de nitrato en un 75%.

(Gao, Yang & Wang, 2013) En este estudio, se determinó el rendimiento fotosintético, la composición de biomasa y la producción de lípidos de microalgas unicelulares marinas *Chaetoceros muelleri* (Bacillariophyceae) y *Dunaliella salina* (Chlorophyceae) cultivadas en diferentes condiciones de privación de nutrientes. Los resultados mostraron que el mayor contenido de lípidos de *C. muelleri* ( $46.32 \pm 3.53\%$ ) y *D. salina* ( $54.15 \pm 2.71\%$ ) podían lograrse mediante nitrógeno y privación completa de nutrientes, respectivamente. El análisis del perfil de ésteres metílicos de ácidos grasos (FAMES) en esas condiciones reveló que el lípido acumulado por las dos especies era adecuado para producir biodiesel.

(Yeh & Chang, 2011) Este estudio investigó el efecto de las estrategias de inanición de nitrógeno y el diseño de fotobiorreactores en el rendimiento de la producción de lípidos y de la fijación de CO<sub>2</sub> de una microalga indígena *Chlorella vulgaris* ESP-31. La comparación de estrategias de inanición de nitrógeno en una etapa y en dos etapas muestra que el cultivo en una sola etapa en medio basal con baja concentración inicial de fuente de nitrógeno (es decir, 0.313 g / L KNO) fue el enfoque más efectivo para mejorar la producción de lípidos microalgales alcanzando una productividad de lípidos de 78 mg / L / d y un contenido de lípidos de 55.9%

(Fernandes *et al.*, 2013) En esta investigación se estudió la relación entre el almidón y la acumulación de lípidos inducida por el agotamiento de nutrientes en la microalga *Parachlorella kessleri*, observando que al reducir los nutrientes se inhibió el crecimiento celular, sin embargo la acumulación de lípidos aumentaron de casi 0 a aproximadamente un 29% de peso en seco.

(Procházková *et al.*, 2013) En su investigación presenta una revisión general sobre el efecto del estado de suministro de nutrientes en la composición de biomasa de microalgas verdes eucariotas, concluyendo

que con el objetivo de optimizar el sistema de producción, la manipulación de nutrientes está entre las técnicas más eficientes para la modulación de crecimiento y composición de biomasa.

(Praveenkumar et al., 2012) En su investigación de la influencia de la privación de nutrientes en la acumulación de lípidos se estudió a una cepa de microalga de agua dulce (*Chlorella sp.*) para producir biomasa y productividad de lípidos bajo diferentes condiciones normales y tratamiento con privación de nutrientes (nitrógeno, fosfato, hierro y los tres). Concluyendo que en condiciones normales después de 20 días de cultivo el organismo produjo una biomasa de  $2.58 \pm 0.07$  g/L, con un contenido de lípidos de  $312.16 \pm 2.38$  mg/g., sin embargo en los tratamientos de privación de nitrógeno produjo la mayor productividad de lípidos de  $53.96 \pm 0.63$  mg/L, seguido de la privación combinada que obtuvo  $49.16 \pm 1.36$  mg/L.d.

(Xin, Hong-ying, Ke & Ying-xue, 2010) En esta investigación estudiaron los efectos de la concentración de nitrógeno y fósforo sobre el crecimiento, la absorción y la acumulación de lípidos de la microalga *Scenedesmus sp.*, como resultado obtuvieron que a saturación de nitrógeno y fósforo la tasa de crecimiento máximo fue de  $2.21 \times 10^6$  cel/ml.d , en relación de N/P de 5:1 – 12:1 podrían eliminar entre 83-99% de nitrógeno y 94% de fósforo, concluyendo y en condiciones de limitación N (2.5 mg/l) y P (0.1 mg/l) podrían acumularse lípidos hasta 30% y 53% respectivamente, sin embargo la productividad de lípidos sobre el volumen de cultivo no fue mejorado.

(Chen et al., 2010) Estudiaron los efectos de los nutrientes sobre el crecimiento y acumulación de lípidos en la microalga *Duanaliella tertiolecta*, resultando que altas concentraciones de nitrato aumentó la densidad máxima de células y la privación de nitrógeno causaron rápida acumulación de lípidos, y aunque el fosfato también es un nutriente principal la privación de este macronutriente tuvo poco efecto en su estudio.

(Pancha, *et al.*, 2014) El objetivo de este estudio fue investigar los efectos de la limitación e inanición de nitrógeno en la microalga *Secenedesmus sp.*, los resultados revelaron que la limitación e inanición secuencial de nitrógeno disminuyen significativamente la actividad fotosintética y el contenido de proteínas en el organismo de la microalga, mientras que la producción de biomasa no se ve afectada, sin embargo la eliminación total de nitrato dio como resultado el lípidos más alto de 27,93% por lo que es potencial para la producción de biodiesel.

(Wu y Miao, 2014) El objetivo de esta investigación fue asociar la calidad del biodiesel con los componentes bioquímicos de las microalgas *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus obliquus* bajo diferentes niveles o concentraciones de nitrato, obteniendo como resultado que la ausencia de nitrato generaba mayores contenido de lípidos con un 54.5% para *Chlorella pyrenoidosa* y 47.7% para *Scenedesmus obliquus*, y tiene cierta relación con la calidad del biodiesel por el número de cetano, índice de yodo en ausencia de nitrato, concluyendo que la presencia de nitrógeno podría limitar la calidad del biodiesel .

(Millán, Torres & Fernández, 2015) En este trabajo se analizó el efecto simultáneo de la concentración inicial de nitrato, la adición de CO<sub>2</sub> y la limitación de nitrógeno en la acumulación de biomasa, lípidos, proteínas y carbohidratos, resultando la mayor producción y productividad de lípidos de 582 mg/L (49, 7% del peso seco) y 41.5 mg/L respectivamente, bajo la concentración inicial de nitrato de 250 mg/L, suministro de CO<sub>2</sub> de 4%, doce días de cultivo y 2 días de inanición de nitrógeno, sobre la microalga *Nannochloropsis oculata*.

(Stephenson *et al.*, 2010) Estudiaron la influencia del régimen de limitación de nitrógeno en la producción de lípidos por *Chlorella vulgaris*, revelando que en condiciones con suficiente contenido de nitrógeno la fracción de lípidos promedio fue de 13.7% de la masa total seca pero con predominancia de fosfolípidos, caso contrario ocurrió en condiciones privadas de nitrógeno en donde el contenido de lípidos aumento a casi el

20% del peso total de células secas obteniendo mayor predominancia de los triacilglicéridos.

### **1.3 Teorías relacionadas al tema**

#### **1.3.1 Biocombustible**

Un combustible es cualquier materia que libera energía al quemarse, que surgen de las profundidades subterráneas, y que se caracterizan por ser no renovables.

Los combustibles fósiles utilizan como materia prima a los restos fósiles que fueron formados por plantas y animales que han estado enterrados durante millones de años, en cambio los biocombustibles se fabrican a partir de plantas cultivadas en la actualidad, considerado como un recurso renovable ya que siempre se puede cultivar más para producir biocombustible.

Los biocombustibles pueden ser un complemento (aplicado en la actualidad) o una alternativa al uso de combustibles fósiles, dividiéndose según su fuente de materia prima en biocombustibles de primera, segunda y tercera generación.

##### **1.3.1.1 Biocombustible de primera generación:**

Esta generación de biocombustible es de la procedencia de cultivos agrícolas destinados a la alimentación.

A primera instancia parecía una nueva alternativa para reemplazar el mercado actual de biodiesel sin embargo diferentes aspectos negativos fueron resaltando en este tipo de biocombustible, en primer lugar por utilizar como materia prima a cultivos destinados a la alimentación ejerciendo para esta actividad una mayor presión en el uso de suelo y generando una disminución en la diversidad de especies por la implementación de monocultivos.

#### **1.3.1.2 Biocombustible de segunda generación:**

Es el obtenido de una biomasa lignocelulosa procedente de residuos agrícolas, forestales, urbanos, o biomasa de plantas no comestibles como hiervas, cuyo objetivo es utilizarla para generar energía. Aunque esta en comparación del biocombustible de primera generación, no compite directamente con los cultivos destinados a la alimentación, tiene al igual que ello el problema de la utilización de grandes terrenos para monocultivos.

#### **1.3.1.3 Biocombustible de tercera generación:**

Los denominados biocombustibles de tercera generación se derivan únicamente de microorganismos. Las microalgas son ahora una de los objetos de estudios más considerados por tener características prometedoras para ser aceptado como recurso energético alternativo, porque carecen de los principales inconvenientes que tienen las otras 2 generaciones de biocombustibles.

Las microalgas son capaces de producir 15-300 veces más petróleo para la producción de biodiesel en comparación con los cultivos tradicionales por área. Además, las plantas de cultivo convencionales generalmente se cosechan solo una o dos veces al año, mientras que las microalgas tienen un ciclo de cosecha muy corto de 10 a 30 días (Singh, Pandey & Gnansounou, 2017)

En la Tabla N°1 se muestra algunas comparaciones de las principales fuentes de biodiesel según su contenido de aceite, uso de suelo, y producción de biodiesel en kilogramos por área de cultivo y tiempo.

**Tabla N° 1.** Comparación de algunas fuentes de biodiesel

<b>CULTIVO</b>	<b>Contenido de aceite de semilla (%/wt biomass)</b>	<b>Producción de petróleo (L/ha year)</b>	<b>Uso de suelo (m<sup>2</sup> year/kg biodiesel)</b>	<b>Producción de Biodiesel (kg/ha year)</b>
<b>Maiz</b> ( <i>Zea mays L.</i> )	44	172	66	152
<b>Cáñamo</b> ( <i>Cannabis sativa L.</i> )	33	363	31	321
<b>Soja</b> ( <i>Glycine max L.</i> )	18	636	18	562
<b>Jatropha</b> ( <i>Jatropha curca L.</i> )	28	741	15	656
<b>Camelina</b> ( <i>Camelina sativa L.</i> )	42	915	12	809
<b>Canola</b> ( <i>Brassica napus L.</i> )	41	974	12	862
<b>Girasol</b> ( <i>Helianthus annus L.</i> )	40	1070	11	946
<b>Castor</b> ( <i>Ricinus communis</i> )	48	1307	9	1156
<b>Palma</b> ( <i>Eaeis guinneensis</i> )	36	5366	2	4747
<b>Microalga</b> (Bajo contenido de aceite)	30	58700	0.2	51927
<b>Microalga</b> (Media contenido de aceite)	50	97800	0.1	86515
<b>Microalga</b> (Alto contenido de aceite)	70	126900	0.1	121104

Fuente: Chisti, 2007

### 1.3.2 Microalga

Las microalgas son un grupo no monofilético, por carecer de un ancestro común, distinguiéndolas en sus diferentes divisiones taxonómicas (phylum, clase, orden, familia, género y especie) que por lo general depende de la asignación de cada autor.

La mayoría de las microalgas son eucariotas mientras que un grupo reducido son procariotas, estas carecen de cromoplastos (encargados de la acumulación de pigmentos), en comparación de la primera que tiene cromoplastos de forma, número y posición variada.

De manera general son organismos unicelulares o pluricelulares que necesitan una fuente de energía como la luz y una fuente de carbono como el CO<sub>2</sub>.

Fotosintéticamente son similares a las plantas terrestres, sin embargo la ausencia de una estructura de soporte como los tallos y raíces favorece mucho para su utilización como materia prima para biodiesel.

#### 1.3.2.1 *Tetraselmis contracta*

La *Tetraselmis contracta* es una microalga del phylum Chlorophyta según información de AlgaeBase (Tabla N° 2), que se caracteriza por su color verde y formar ovalar teniendo un diámetro 10 µm aproximadamente, como se muestra en la Figura N° 1.



**Figura N° 1.** Microalga *Tetraselmis contracta* bajo microscopía óptica. Fuente: IMARPE, 2006



**Tabla N° 2.** Taxonomía de la *Tetraselmis contracta*

<b>Phylum</b>	<b>Chlorophyta</b>
<b>Clase</b>	Chlorodendrophyceae
<b>Orden</b>	Chlorodendrales
<b>Familia</b>	Chlorodendraceae
<b>Género</b>	Tetraselmis
<b>Especie</b>	<i>Tetraselmis contracta</i>

Fuente: AlgaeBase, 2018.

### **1.3.3 Crecimiento de la microalga**

El crecimiento de la microalga depende de las condiciones físicas y químicas, evidenciando sus efectos en su proceso de crecimiento.

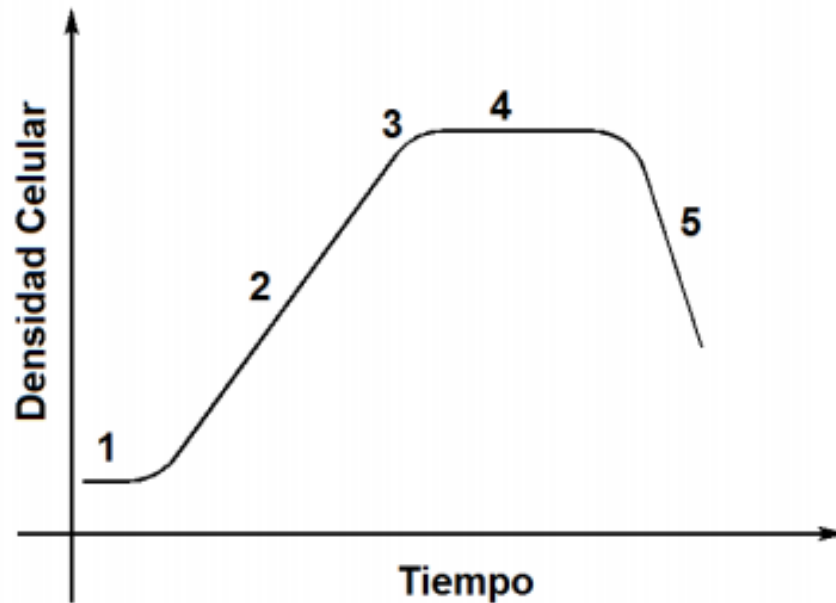
Las microalgas en su proceso de crecimiento tienden a formar una curva como se muestra en la Figura N° 2, determinada por la densidad celular.

La curva de crecimiento se identifica por las siguientes fases:

- 1.3.3.1 Fase de latencia o adaptación:** En esta fase el comportamiento inicial depende de las condiciones de las células del inóculo de las cuales también depende el éxito del nuevo cultivo.
- 1.3.3.2 Fase exponencial:** La velocidad de crecimiento adquiere su valor máximo, y por tanto la concentración celular aumenta rápidamente, pero por lo general sin alcanzar valores muy elevados.
- 1.3.3.3 Fase de desaceleración:** En esta fase la disponibilidad de algunos factores que regulan el crecimiento disminuye ocasionando que la tasa de división celular disminuya, considerando al medio como en un estado de condiciones sub-óptimas.
- 1.3.3.4 Fase estacionaria:** Se caracteriza por formar una línea horizontal en la gráfica tiempo vs. Densidad celular. La

concentración celular permanece constante donde su natalidad es igual a la mortalidad.

**1.3.3.5 Fase de muerte:** En esta fase la tasa de mortalidad es superior a la de natalidad, dando como ello una disminución en la concentración celular.



**Figura N° 2.** Curva y fases de crecimiento de las microalgas. Fuente: Fogg y Take, 1987

#### **1.3.4 Medio de cultivo**

El medio de cultivo para microalgas se caracteriza por tratar de tener las condiciones naturales de donde se ha extraído a la especie, por ello existen diferentes medios de cultivos según ciertas características de la especie microalgal.

En general los medios se dividen para agua dulce y agua de mar, y entre los más utilizados se encuentra el medio CHU10 y Guillard f/2 para cada medio respectivamente.

La elección de un medio en especial, está condicionada por los requerimientos nutricionales de la microalga elegida, la disponibilidad de los nutrientes y las condiciones de cultivo.

### 1.3.4.1 Medio Guillard f/2

El medio Guillard f/2 está conformado como la mayoría de medios por nitratos, fosfato, silicato de sodio, solución de metales trazas y solución de vitaminas, diferenciándolo por la cantidad de stock como se muestra en la Tabla N° 3.

Es importante tener la mayor exactitud posible en la medición de los stocks para la preparación del medio homogenizando bien y evitando su contaminación.

**Tabla N° 3.** Composición de Medio Guillard f/2

<b>NITRATO DE SODIO</b>	75g.L-1
<b>FOSFATO DE SODIO</b>	5g.L-1
<b>SILICATO DE SODIO</b>	30g.L-1
<b>SOLUCIÓN DE METALES TRAZAS</b>	
Cloruro Férrico	3.15g.L-1
Na <sub>2</sub> EDTA 2H <sub>2</sub> O	4.36g.L-1
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	3.93x10-8M
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	2.60x10-8M
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	7.65x10-8M
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	4.20x10-8M
MnCl <sub>2</sub> 4H <sub>2</sub> O	9.10x10-7M
<b>SOLUCIÓN DE VITAMINAS</b>	
Tiamina HCL (Vit B1)	200mg.L-1
Biotina (vit. H)	2.05x10-9M
Cyanocobalamina (vit. B12)	3.69x10-10M

Fuente: Guillard and Ryther, 1962; Guillard, 1975

### 1.3.5 Nutrientes principales

**1.3.5.1 Carbono:** Las fuentes de carbono pueden ser orgánica o inorgánica, dependiendo de su modo nutricional, fotoautotróficamente (modo nutricional más conocido) las microalgas utilizan al CO<sub>2</sub> como fuente de carbono y la luz como fuente de energía, heterotróficamente, utilizan

compuestos orgánicos como la glucosa y el glicerol siendo estas fuentes de carbono y energía por eso crecen en ausencia de luz (Chojnacka y Marquez, 2004) y mixotróficamente utilizan tanto carbono orgánico e inorgánico y captan la energía de la luz.

**1.3.5.2 Nitrógeno:** El requerimiento de nitrógeno, es después del carbono el más importante elemento contribuyente en el crecimiento y por tanto formación de materia seca de células algales.

Existen diferentes compuestos de nitrógeno orgánico o inorgánico que sirven como fuentes de nitrógeno para el crecimiento de las microalgas.

Cuando el nitrógeno se absorbe en forma oxidada como nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), debe reducirse antes de que pueda incorporarse a las moléculas orgánicas.

**1.3.5.3 Fósforo:** El fósforo también es un elemento principal requerido para el crecimiento de la microalga, desempeñando un papel muy importante en la transferencia de energía y en la síntesis de ácido nucleico.

### **1.3.6 Parámetros medioambientales**

Los parámetros medioambientales en cultivo son las condiciones que se establece para el medio de cultivo, en donde se toma en cuenta principalmente la salinidad, fotoperiodo temperatura, pH y aireación.

Cada uno de estos parámetros afecta de manera particular al metabolismo de las microalgas.

**1.3.6.1 Salinidad:** La salinidad es un parámetro que puede afectar en el crecimiento microalgal y adquiere mayor influencia cuando se relaciona con otros factores o parámetros medioambientales.

- 1.3.6.2 Luminosidad:** Para los medios se puede utilizar luz natural o artificial depende a las exigencias de la especie y los volúmenes de cultivo. También se toma en cuenta la intensidad luminosa medida en lux (si está va a ser controlada)
- 1.3.6.3 Temperatura:** El rango de temperatura aceptable para el máximo crecimiento de las microalgas está de 15°C a 24°C. Este parámetro también varía depende a la especie microalgal a estudiar.
- 1.3.6.4 pH:** El pH es un factor muy importante, debido a que se relaciona con la solubilidad del CO<sub>2</sub> y de los minerales, por eso según estudios se recomienda un pH de entre 6.5 a 8.5, de manera general, sin embargo hay excepciones en las microalgas para su crecimiento óptimo necesitan un pH más alcalino.
- 1.3.6.5 Aireación / agitación:** Según el volumen del cultivo se aplica la aireación o agitación. Para volúmenes pequeños basta con un movimiento mecánico para homogenizar el medio y prevenir la sedimentación, en cambio para grandes volúmenes se requiere ya de un equipo para que haga una aireación contante por que la tendencia de que se sedimenten y la productividad baje es mayor

### **1.3.7 Composición de la microalga**

Las microalgas están compuestas principalmente de carbohidratos, proteínas y lípidos que dependiendo de la cepa microalga y sus diferentes condiciones de cultivos, difieren en cuanto a la proporcionalidad.

Entre ellos el más importante para la producción de biodiesel son los lípidos buscando por lo tanto que las concentraciones de éstos sean las más altas posibles.

#### **1.3.7.1 Lípidos en la microalga**

El contenido de lípidos en las microalgas es uno de los parámetros importantes para la reducción de costos en el proceso de obtención de biodiesel.

El porcentaje de lípidos que se encuentra normalmente en las microalgas está entre un rango de 20 -50 % del peso seco, sin embargo estos pueden ser alterados mediante la optimización de factores entre ellos la concentración de nitrato, fosfatos, dióxido de carbono, intensidad de luz, etc.

#### **1.3.8 Extracción de lípidos**

Para la producción de biodiesel se siguen diferentes procesos hasta la obtención de lípidos para que puedan ser transformados a biodiesel por un proceso de transesterificación.

Para la extracción de los lípidos de las microalgas existentes diferentes métodos que por lo general utilizan como principales insumos los solventes orgánicos como el cloroformo, éter, hexano, etc.

**1.3.8.1 Método Folch:** Este método está basado en la mezcla cloroformo: metanol (2:1) que tienen la capacidad de disolver lípidos neutros y lípidos polares. Este método obtiene mayores rendimientos en comparación que el de Bligh & Dyer para lípidos mayores al 2% debido a que produce mejores resultados de contenido de lípidos (Iverson, Lang & Cooper, 2001).

#### **1.3.9 Estimación de la producción de biodiesel**

##### **1.3.9.1 Biodiesel**

El biodiesel es la mezcla de éster monoalquílico de ácidos grasos obtenido por lo general de aceites vegetales (Rashi et al., 2009).

Para la obtención de biodiesel los aceites pasan por modificaciones para ser usados como tal, alguno de los procesos son la

transesterificación (comúnmente utilizada), la dilución con solvente adecuado, pirolisis y emulsificación (Solua *et al.*, 2010).

### 1.3.9.2 Determinación del rendimiento

El rendimiento de la producción de biodiesel se determina por la cantidad de biodiesel obtenido sobre la cantidad de aceite utilizado.

En la siguiente tabla se muestra algunos rendimientos dependiendo a las condiciones en la que se encuentra el aceite (desechado, usado y fresco) como se muestra en la Tabla N° 4, que se tomará en cuenta para estimar la producción de biodiesel.

**Tabla N° 4.** Rendimiento del biodiesel

<b>Muestra</b>	<b>Biodiesel crudo (%v/v)</b>	<b>Biodiesel purificado (%v/v)</b>
<b>Desechado</b>	75.80	72.80
<b>Usado</b>	87.80	81.50
<b>Fresco</b>	86.60	75.00

Fuente: Ordoñez *et al.*, 2013

## 1.4 Formulación del problema

### 1.4.1 Problema general

- ¿Cuál es la concentración de nitrato que permitirá obtener el mayor contenido lipídico por unidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*?

### 1.4.2 Problemas específicos

- ¿Cuál es la concentración de nitrato que permitirá obtener la mayor densidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*?

- ¿Cuál es la concentración de nitrato que permitirá obtener el mayor contenido de lípidos por unidad de volumen de la microalga *Tetraselmis contracta*?

## 1.5 Justificación del estudio

El querer estudiar nuevas alternativas biotecnológicas para la producción de biodiesel es por el contexto actual a la que estamos inmersos debido al impacto ambiental generado por la sobreexplotación de los recursos fósiles, además el incremento del uso de biocombustible equivale a 6 de los 20 puntos que se tomaron en cuenta en la COP 21 para la reducción de los gases de efecto invernadero que se tiene como meta para el año 2030.

Para considerar las diferentes materias primas para la generación de biocombustibles se debe de tomar en cuenta que la nueva alternativa no debe influir en daños graves al medio ambiente ni interrumpir el suministro de alimentos (Rittman, 2008), bajo este enfoque las microalgas son considerado una alternativa sostenible, debido a que no compiten con el suministro de alimentos ni utilización áreas de terreno además sacan una gran ventaja respecto a las otras generaciones de biocombustibles ya que estas reducen las emisiones de gases de efecto invernadero, tienen una estructura menos compleja, una tasa de crecimiento rápido y altas características de contenido de aceite.

Sin embargo para la producción sostenible y comercialmente exitosa de biocombustible se necesita considerar la eficiencia de la utilización de nitrógeno, intensidad luminosa, dióxido de carbono, etc. (Chi *et al.*, 2015) Uno de los parámetros más importantes que determina la economía es el contenido de lípidos de las microalgas debido a que es uno de sus principales compuestos de energía. Este estudio por eso pretende dar un acercamiento sobre la producción de lípidos bajo ciertas concentraciones de nitrato para optimizar el contenido lipídico de la microalga *Tetraselmis*



*contracta* con el objetivo de que puedan ser consideradas como materia prima para su potencial uso como biodiesel.

## **1.6 Hipótesis**

### **1.6.1 Hipótesis general**

- La concentración de 0mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), permitirá obtener el mayor contenido lipídico por unidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*.

### **1.6.2 Hipótesis específicos**

- La mayor concentración de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), permitirá obtener la mayor densidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*.
- Los valores centrales de concentración de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), permitirá obtener el mayor contenido de lípidos por unidad de volumen de la microalga *Tetraselmis contracta*.

## **1.7 Objetivos**

### **1.7.1 Objetivo general**

Determinar la concentración de nitrato que permitirá obtener el mayor contenido lipídico por unidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*

### **1.7.2 Objetivos específicos**

- Determinar la concentración de nitrato que permitirá obtener la mayor densidad celular de la microalga *Tetraselmis contracta*.
- Determinar la concentración de nitrato que permitirá obtener el mayor contenido de lípidos por unidad de volumen de la microalga *Tetraselmis contracta*.

## II. MÉTODOS

### 2.1 Diseño de investigación

El diseño de investigación se refiere a la estrategia concebida para obtener la información que deseada con el fin de responder al planteamiento del problema (Hernández *et al.*, 2014)

La presente investigación que trata del estudio del contenido lipídico de la microalga *Tetraselmis contracta* respecto a la concentración de nitratos es de tipo experimental debido a que la variable independiente es manipulada en las unidades de tratamiento. Everrit (1998), lo define como un estudio en donde el investigador puede influenciar deliberadamente en los eventos e investigar los efectos de la intervención.

El estudio se ha asignado aleatoriamente a diferentes grupos de tratamiento. Este proceso está diseñado para que los grupos sean comparables, lo que significa que cualquier tratamiento tiene una posibilidad igual e independiente de ser asignado a cualquiera de los grupos (Kumar, 2014).

Para el diseño se tuvo 5 niveles como se muestra en la Tabla N° 5 , cada nivel presentó 3 réplicas que se detallan en la Tabla N° 6.

Tipo de diseño: 5<sup>1</sup>

**Tabla N° 5.** Niveles del factor de investigación

Factor	Niveles	Valores
Concentración de nitratos (mM)	5	0.00; 0.88; 1.76; 2.65; 3.53

Fuente: Elaboración propia

**Tabla N° 6.** Tratamientos del diseño experimental

<b>TRATAMIENTOS</b> <b>(Concentración de nitrato</b> <b>mM)</b>	<b>RÉPLICAS</b>		
<b>0</b>	A <sub>1</sub>	A <sub>2</sub>	A <sub>3</sub>
<b>0.88</b>	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>3</sub>
<b>1.76</b>	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>	C <sub>3</sub>
<b>2.65</b>	D <sub>1</sub>	D <sub>2</sub>	D <sub>3</sub>
<b>3.53</b>	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>	E <sub>3</sub>

Fuente: Elaboración propia

El nivel de investigación es de carácter explicativo por centrarse en la explicación de la ocurrencia de un fenómeno. Los estudios explicativos se centran en explicar por qué ocurre un fenómeno y en qué condiciones se manifiesta (Hernández *et al.*, 2014).

En cuanto al enfoque de la investigación es de tipo cuantitativo debido a que la recolección de datos se realizó con base de una medición numérica haciendo un análisis estadístico con el objetivo de probar teorías. Este enfoque está definido como un conjunto de procesos secuencial y probatorio que busca medir y estimar magnitudes de los problemas de investigación utilizando métodos estadísticos (Hernández *et al.*, 2014)

En cuanto al tipo de investigación es de tipo aplicada ya que el presente estudio busca convertir el conocimiento puro en conocimiento práctico para la vida de la civilización humana, constituyendo los primeros esfuerzos para transformar los conocimientos científicos en tecnología.

## 2.1.1 Procedimiento

### 2.1.1.1 Proceso de lavado y esterilización

Todos los materiales utilizados se lavaron con detergente neutro, seguido de enjuague y secado a fondo.

Los materiales se esterilizaron por la técnica de calor seco a 180°C por un periodo de 2 horas. Las pipetas utilizadas diariamente para el conteo celular siguieron el mismo procedimiento de lavado siendo enjuagadas con agua destilada y esterilizadas por calor seco.



**Figura N° 3.** Esterilización de materiales. Fuente: Elaboración propia

### 2.1.1.2 Preparación del medio de cultivo

La preparación del medio de cultivo se realizó comenzado con la obtención agua de mar de la costa verde de buena calidad con una salinidad promedio de 42.5ppm.

El agua de mar fue filtrada y almacenada en una zona oscura y fría, posteriormente se le agregó los macronutrientes (nitrógeno y fósforo), trazas metales y vitaminas realizándolo de manera aséptica esterilizando finalmente en autoclave.

Para los stock del medio se tomó como referencia al medio Guillard (f/2) cambiando las concentraciones de nitrato de sodio ( $\text{NaNO}_3$ ) para los diferentes niveles de tratamiento de la investigación.

El primer nivel tratamiento fue preparado sin agregado de nutrientes (tratamiento A), los demás tratamiento tuvieron las siguientes concentraciones: 0.88mM, 1.76mM, 2.65mM y 3.53mM para los tratamientos B, C, D y E respectivamente, cada una con 3 réplicas.



**Figura N° 4.** Preparación y distribución de los medios de cultivo. Fuente: Elaboración propia

Después de la preparación de los medios de cultivo todos los tratamientos fueron inoculados con un volumen de 10ml de una cepa de microalga *Tetraselmis Contracta* de concentración de  $1.04 \times 10^6$  cel/ml y rotulados como se muestra en la Figura 5.



**Figura N° 5.** Inoculación y rotulado de los cultivos. Fuente: Elaboración propia

### 2.1.1.3 Conteo celular

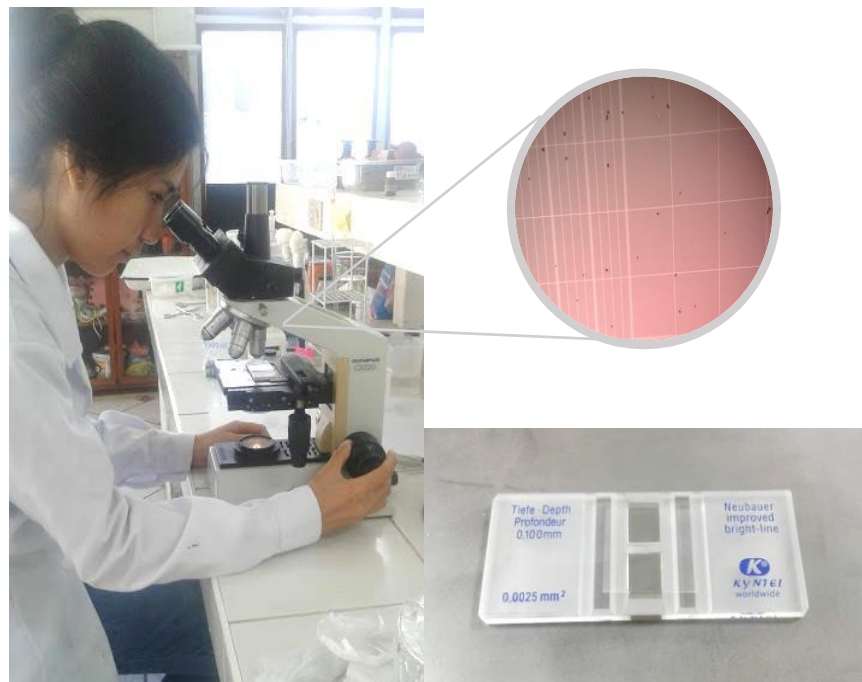
Para el conteo celular microalgal se sacó una alícuota de 1ml del matraz, homogenizándolo previamente, y con las medidas asépticas necesarias, como la utilización de la cabina de bioseguridad y mechero para evitar la contaminación de los cultivos. El contenido celular de la alícuota se pasó a

un vaso precipitado de 10ml agregándole una gota de lugol para fijar e impedir el movimiento celular.



**Figura N° 6.** Extracción de una alícuota para el conteo celular. Fuente: Elaboración propia

Se echó en la cámara de Neubauer una gota del contenido celular colocando el cubreobjeto para su posterior conteo como se muestra en la Figura N° 7.



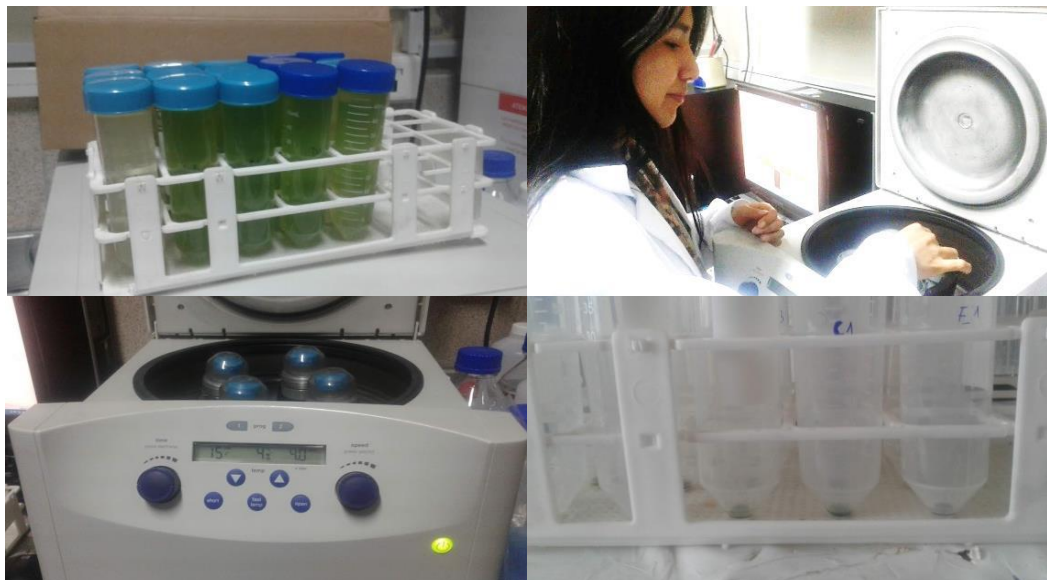
**Figura N° 7.** Conteo celular. Fuente: Elaboración propia

Luego se realizó el registro contando todas las células que se observaron en las 4 esquinas de los cuadrados y convirtiéndolo por fórmula a cel/ml. Los recuentos para formar la curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta*, en los diferentes niveles de tratamiento, se realizaron diariamente.

#### 2.1.1.4 Determinación del contenido de lípidos

Para la determinación del contenido de lípidos se siguió el método de extracción Folch modificado por IMARPE, por ser considerado el método más confiable según la literatura científica debido a que extrae lípidos totales, gracias a la combinación de un solvente relativamente polar y uno no polar.

Primero se centrifugó los cultivos en tubos falcon de 50ml, para la separación de fases a 4000rpm por 15min a 4°C, como se muestra en la Figura 7., y se decantó el sobrenadante de manera simple debido a que el pellet formado fue compacto.



**Figura N° 8.** Centrifugación y formación de pellets. Fuente: Elaboración propia

Se preparó una mezcla de cloroformo: metanol (2:1), con la medida de seguridad necesaria de protección personal, adicionando 3ml a los pellets

formados en los tubos falcon, homogenizándolo por baño de ultrasonido por unos segundos.

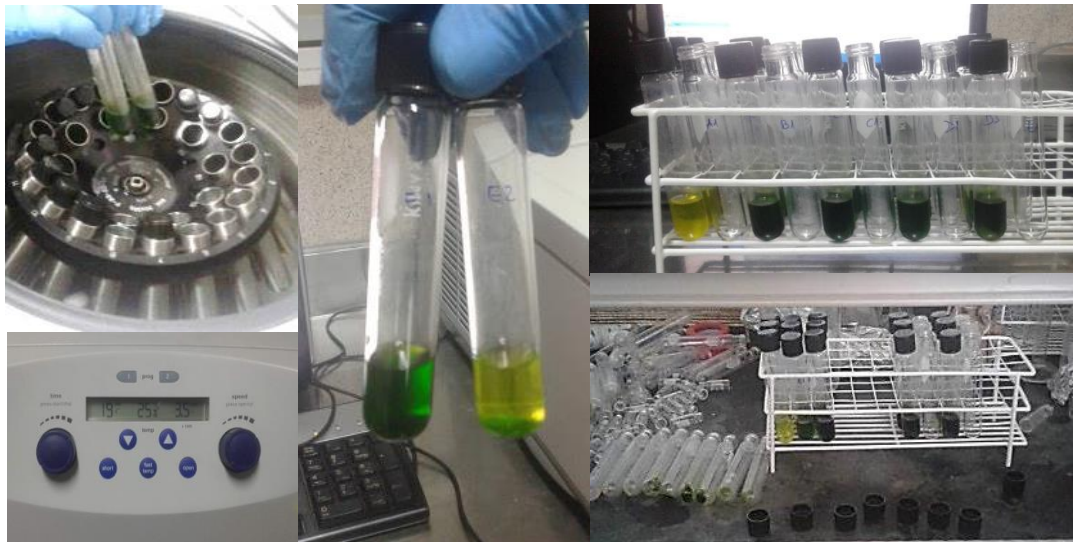
Luego se transfirieron los contenidos en tubos de 10 ml, colocándolos en un baño de ultrasonido durante 45 minutos y refrigerándolo posteriormente por un periodo de 16 horas con el objetivo de favorecer la extracción completa de los lípidos y por último volver a someter al baño de ultrasonidos.



**Figura N° 9.** Preparación de la mezcla Cloroformo: metanol (2:1). Fuente: Elaboración propia

Después de someter al pellet a la solución cloroformo metanol siguiendo el proceso para la correcta y eficaz extracción, los tubos de 10ml se centrifugaron a 3500rpm por 20 minutos a 4°C, recuperando el extracto con una pipeta Pasteur y transfiriéndolo a un segundo tubo de vidrio de 10ml como se observa en la Figura N° 10.





**Figura N° 10.** Separación de los lípidos de la biomasa. Fuente: Elaboración propia

Se le agregó 750  $\mu$ l de agua ultrapura mezclada con cloruro de potasio con una micropipeta agitándolo en el vortex por alrededor de 30 segundos, para separar al metanol de la solución y facilitar su secado.



**Figura N° 11.** Preparación de la mezcla: agua ultra pura y KCl. Fuente: Elaboración propia.

Luego fueron centrifugados a 2000rpm por 10 minutos a 25°C, provocando la separación de fases, en la parte inferior formada por cloroformo y lípidos

que se extrajo introduciendo una pipeta pasteur y burbujeando, colocándolo en un vial de 4ml seco y limpio previamente pesado.



**Figura N° 12.** Separación de fases Cloroformo: metanol. Fuente: Elaboración propia.

La fase cloroformo lípido en el vial de 4ml se secó con el evaporador/concentrador y posteriormente se llevó a la estufa de vacío.



**Figura N° 13.** Secado con evaporador/concentrador y estufa de vacío. Fuente: Elaboración propia

Finalmente se pesó el vial con el contenido de lípido y restándolo con el peso inicial del vial obteniendo como resultado el contenido de lípidos en microgramos ( $\mu\text{g}$ ).



**Figura N° 14.** Contenido de lípidos totales en el vial. Fuente: Elaboración propia

## 2.2 Variables

### 2.2.1 Variable independiente

- Concentración de nitratos

### 2.2.2 Variable dependiente

- Contenido lipídico celular

**Tabla N° 7.** Matriz de operacionalización

VARIABLE	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	DIMENSIONES	INDICADORES
Concentración de nitrato. INDEPENDIENTE	El nitrato (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ) es la forma estable de las estructuras oxidadas del nitrógeno que sirve como nutrientes a varios organismos microbiológicos (Antón y Lizaso, 2001)	Se tendrá diferentes concentraciones de nitrato para los 5 niveles de tratamiento para ver su relación con el contenido lipídico celular.	Dosis	mM
			Parámetros del cultivo	pH
				°C
				ppm
			lux	

Contenido lipídico celular DEPENDIE NTE	La productividad lipídica es la capacidad de producción de lípidos por tiempo volumen de cultivo	Se determinará el contenido lipídico para ver la cantidad de lípidos por volumen de cultivo y por unidad celular.	Densidad celular	cel/ml
			Lípidos contenido por volumen de cultivo	mg/L

Fuente: Elaboración propia

## 2.3 Población y muestra

### 2.3.1 Población

- Cepa de la microalga *Tetraselmis contracta* del laboratorio de cultivo menores de la Facultad de Ingeniería Acuícola - Universidad Nacional Federico Villareal

### 2.3.2 Muestra

- 150ml de la cepa *Tetraselmis contracta* para inocular los 15 tratamientos de estudio.

## 2.4 Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

**2.4.1 Técnica:** La investigación se llevó a cabo mediante observación y medición directa, para el recuento celular se utilizó la técnica de conteo diario para poder ir observando la curva de crecimiento y la metodología de Floch para la determinación de lípidos.

**2.4.2 Instrumento:** Los instrumentos de recolección de datos se hizo con hojas de registro que parten del diseño experimental, considerando que n instrumento de medición adecuado registra datos que representan claramente las variables de la investigación. (Williams, Unrau y Grinnel, 2009)

**2.4.3 Validez:** La validez se refiere al grado en que un instrumento refleja con claridad el contenido de la variable a medir. La validez para los instrumentos se realizó bajo el criterio de expertos en el área.

**2.4.4 Confiabilidad:** La confiabilidad se refiere al grado en que a la aplicación del instrumento produce resultados coherentes. Sin embargo para este tipo de investigación que utilizará fichas de registro simple no es necesario determinar la confiabilidad para este tipo de instrumento.

## **2.5 Métodos de análisis de datos**

Para la presente investigación se utilizará el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, cumpliendo con los 3 supuestos mínimos para su aplicación (Normalidad de residuos, homocedasticidad e independencia de los residuos), para determinar si las medias de las poblaciones son significativamente diferentes, evaluando la importancia del factor al comparar las medias de la variable de respuesta en los diferentes niveles del factor.

En este análisis se establece lo siguiente:

- $H_0$ : No hay diferencia significativa entre las medias
- $H_a$ : Las medias son significativamente diferentes

También se utilizará el método de comparaciones múltiples “post-hoc” de Tukey para tener una información más detallada sobre las diferencias entre las medias.

## **2.6 Aspectos éticos**

El investigador se compromete a respetar la veracidad de los resultados, la confiabilidad de los datos recibidos por el laboratorio.

### III. RESULTADOS

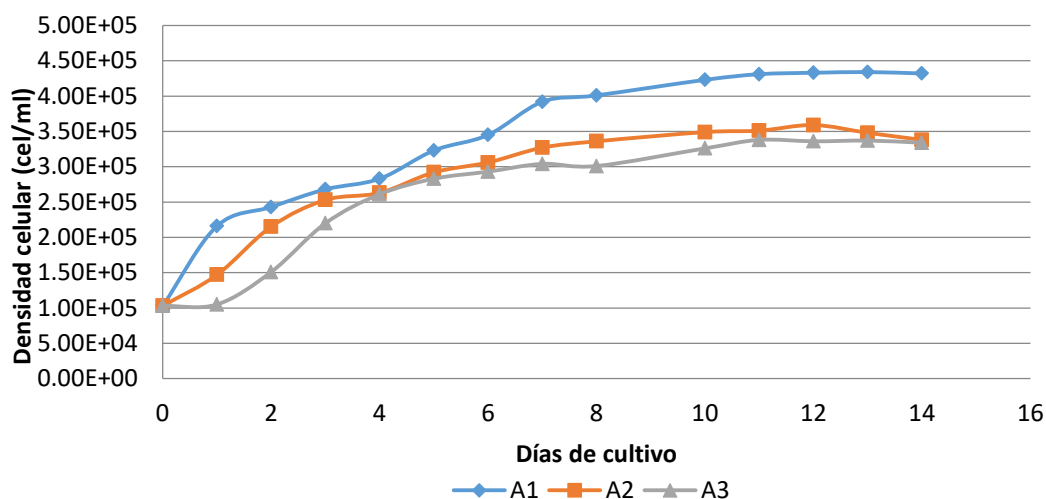
#### 3.1 Análisis descriptivo

##### 3.1.1 Curva de crecimiento y densidad celular

Todos los tratamientos en el día cero iniciaron con la misma concentración celular, con un valor aproximado de  $1.04 \times 10^5$  cel/ml (valor teórico obtenido por la densidad y volumen del inóculo).

En la Gráfica N° 1 se muestra la curva de crecimiento de la microalga *T. contracta* bajo una concentración de 0 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) describiendo un crecimiento relativamente rápido en los primeros días pero sin alcanzar altas densidades celulares.

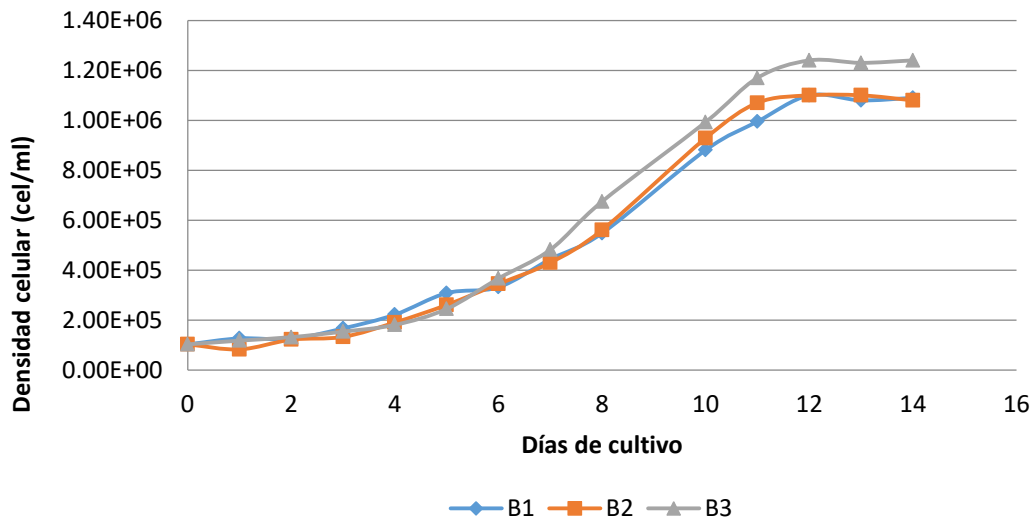
Las mayores densidades celulares en el tratamiento A fueron de  $4.34 \times 10^5$ ,  $3.59 \times 10^5$  y  $3.38 \times 10^5$  cel/ml por cada réplica dentro de los días de la fase estacionaria.



**Gráfica N° 1.** Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo una concentración de 0 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ). Fuente: Elaboración propia.

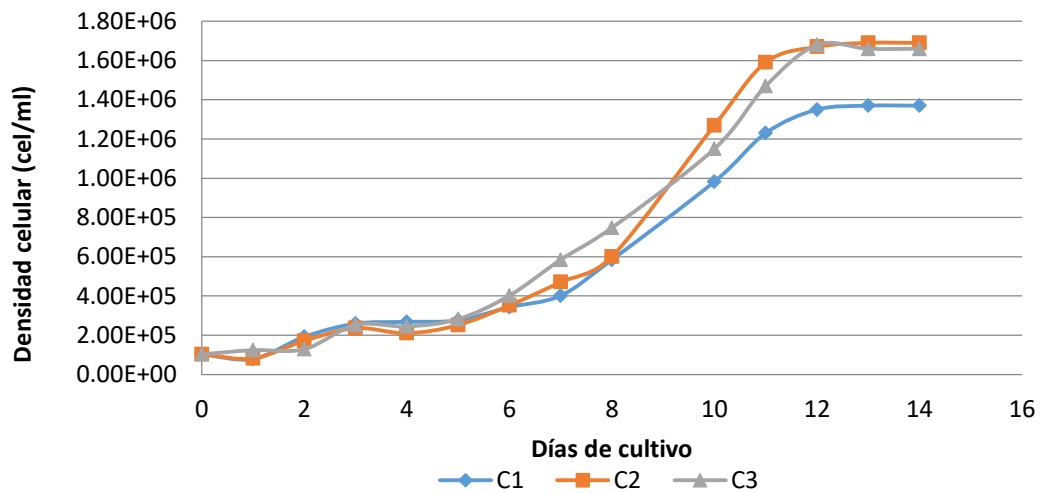
A concentración de 0.88mM de nitratos se observó que apartir del quinto día la microalga iniciaba la fase exponencial del crecimiento y apartir del

onceavo día con la fase estacionaria (Gráfica N°2), alcanzando valores relativamente altos en el tratamiento B, obteniendo como máximo valor de densidad celular de  $1.10 \times 10^6$  cel/ml en las réplicas B1 y B2, y  $1.24 \times 10^6$  cel/ml en la réplica B3.



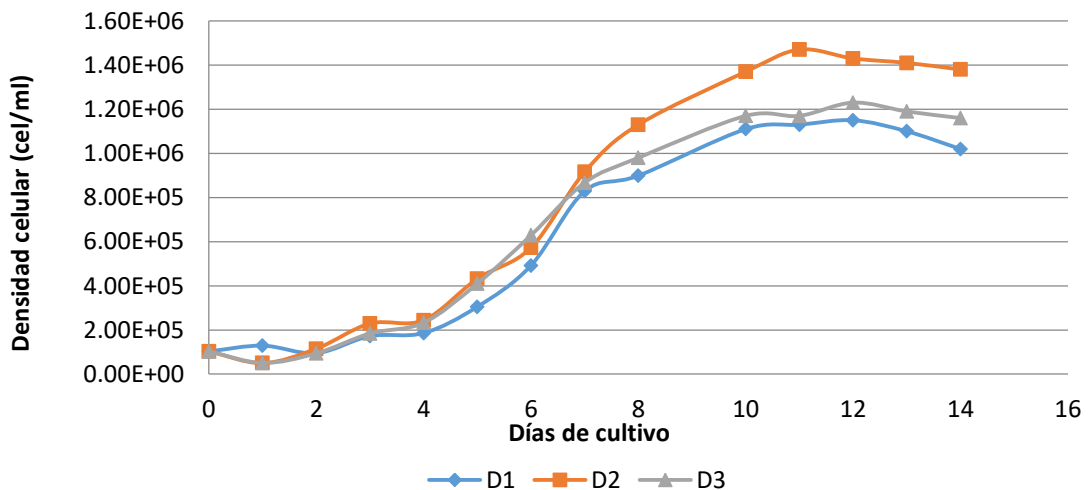
**Gráfica N° 2.** Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo una concentración de 0.88 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ). Fuente: elaboración propia.

La curva de crecimiento que describió el tratamiento C (Gráfica N° 3) que tenía una concentración de 1.76 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), alcanzó las mayores densidades celulares entre todos los tratamientos obteniendo  $1.37 \times 10^6$ ,  $1.69 \times 10^6$  y  $1.68 \times 10^6$  cel/ml, en las réplicas C1, C2 y C3 respectivamente, dentro de su fase estacionaria, sin embargo en los primeros días se observó una disminución de su densidad celular, alcanzando adaptarse en el 4 día comenzando a realizar una curva exponencial.



**Gráfica N° 3.** Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo una concentración de 1.76 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ) Fuente: elaboración propia.

A concentración de 2.65 mM de nitratos se observó que apartir del cuarto día la microalga iniciaba la fase exponencial de crecimiento(Gráfica N° 4), obteniendo como máximos valores de densidad celular  $1.15 \times 10^6$ ,  $1.47 \times 10^6$  y  $1.23 \times 10^6$  cel/ml en las réplicas D1, D2 y D3 respectivamente

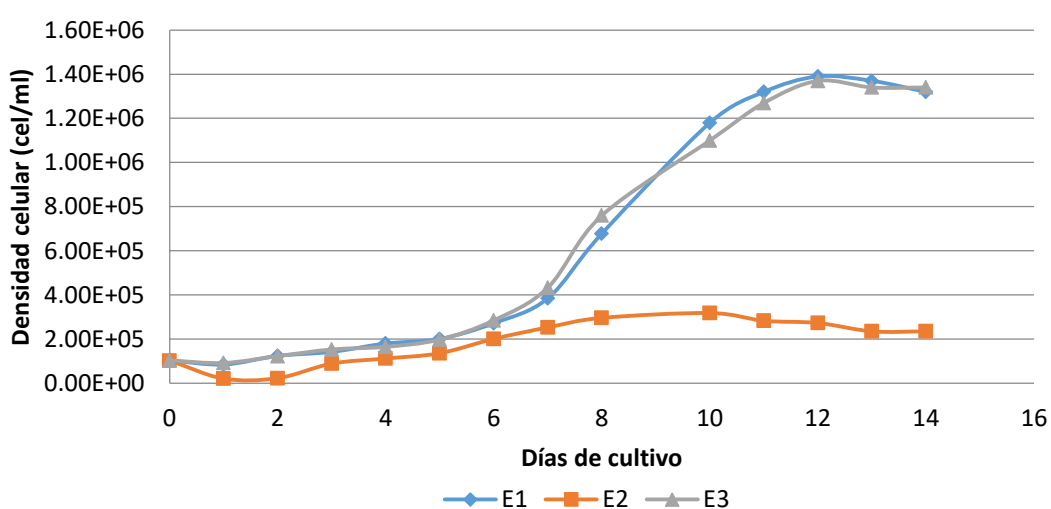


**Gráfica N° 4.** Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo una concentración de 2.65 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ). Fuente: Elaboración propia.



En el tratamiento E a diferencia de los demás tratamientos, hubo un resultado totalmente diferente a sus réplicas.

La réplica E3 mostró un comportamiento totalmente distinto como se muestra en la Gráfica N° 5, bajo microscopio se observó que en esta replica la microalga se encontraba en estadio de su ciclo de vida diferente como se observa en la Figura N° 16, sin embargo no se sabe que ocasiono dicha reacción en la microalga por la cual en los análisis estadístico no ha sido tomada en cuenta por representar un valor atípico, sin embargo se detallará su resultado de forma individual



**Gráfica N° 5.** Curva de crecimiento de la microalga *Tetraselmis contracta* bajo una concentración de 3.53 mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ). Fuente: Elaboración propia.



**Figura N° 15.** Estadío de vida predominante en la réplica E2 bajo microscopía a un enfoque de 100x. Fuente: Elaboración propia



**Figura N° 16.** Microalga *Tetraselmis contracta* fijada con lugol – enfoque 40x.

Los datos del último día de la densidad celular en todos los tratamientos se muestran en la Tabla N° 7, obteniendo como mayor valor  $1.69 \times 10^6$  cel/ml en el tratamiento C y el mínimo valor  $3.34 \times 10^5$  cel/ml en el tratamiento A, sin tomar en cuenta la réplica E2 que obtuvo un valor de  $2.35 \times 10^5$  cel/ml.

**Tabla N° 8.** Densidad celular en el último día de cultivo

	<b>Concentración de Nitrato (mM)</b>	<b>Densidad celular (cel/ml)</b>
<b>A1</b>	0	4.32E+05
<b>A2</b>	0	3.38E+05
<b>A3</b>	0	3.34E+05
<b>B1</b>	0.88	1.09E+06
<b>B2</b>	0.88	1.08E+06
<b>B3</b>	0.88	1.24E+06
<b>C1</b>	1.76	1.38E+06
<b>C2</b>	1.76	1.69E+06
<b>C3</b>	1.76	1.66E+06
<b>D1</b>	2.65	1.02E+06
<b>D2</b>	2.65	1.38E+06
<b>D3</b>	2.65	1.19E+06
<b>E1</b>	3.53	1.40E+06
<b>E2</b>	3.53	2.35E+05
<b>E3</b>	3.53	1.41E+06

Fuente: Elaboración propia

### 3.1.2 Contenido de lípidos por volumen de cultivo

El contenido de lípidos final se obtuvo por la diferencia de los pesos de vial y dividido entre 50 ml, que fue el volumen de medio de cultivo que se utilizó para la extracción de lípidos para los diferentes tratamientos.

**Tabla N° 9.** Concentración de lípidos (mg/L)

<b>Concentración de nitratos (mM)</b>	<b>Peso Vial</b>	<b>Peso vial+lípidos</b>	<b>Peso lípidos1 (ug)</b>	<b>Concentración de lípidos(mg/L)</b>
<b>0</b>	4631123	4632183	1060	21.20
<b>0</b>	4605681	4606211	530	10.60
<b>0</b>	4586433	4586892	459	9.18
<b>0.88</b>	4628303	4629449	1146	22.92
<b>0.88</b>	4569563	4570652	1089	21.78
<b>0.88</b>	4690148	4691398	1250	25.00
<b>1.76</b>	4647669	4649260	1591	31.82
<b>1.76</b>	4563573	4565677	2104	42.08
<b>1.76</b>	4598530	4600666	2136	42.72
<b>2.65</b>	4561027	4562226	1199	23.98
<b>2.65</b>	4838531	4840515	1984	39.68
<b>2.65</b>	4589685	4591220	1535	30.70
<b>3.53</b>	4618336	4620360	2024	40.48
<b>3.53</b>	4647711	4648349	638	12.76
<b>3.53</b>	4609169	4611340	2171	43.42

Fuente. Elaboración propia

El mayor contenido de lípidos fue de 43.42 mg/L, del tratamiento que tenía una concentración de nitrato de 3.53 mM, y el menor fue de 9.18 mg/L en el tratamiento de 0 mM de concentración de nitrato.

### 3.1.3 Contenido lipídico celular (pg/cel)

El contenido lipídico celular se obtuvo entre la división de la concentración de lípidos entre la densidad celular como se muestra en la Tabla N° 10.

**Tabla N° 10.** Contenido lipídico celular

	<b>Concentración de nitratos (mM)</b>	<b>Concentración de lípidos (µg/mL)</b>	<b>Densidad celular (cel/mL)</b>	<b>Concentración lipídica celular pg/cel</b>
<b>A1</b>	0	21.20	432000	49.07
<b>A2</b>	0	10.60	338000	31.36
<b>A3</b>	0	9.18	334000	27.49
<b>B1</b>	0.88	22.92	1090000	21.03
<b>B2</b>	0.88	21.78	1080000	20.17
<b>B3</b>	0.88	25.00	1240000	20.16
<b>C1</b>	1.76	31.82	1370000	23.23
<b>C2</b>	1.76	42.08	1690000	24.90
<b>C3</b>	1.76	42.72	1660000	25.73
<b>D1</b>	2.65	23.98	1020000	23.51
<b>D2</b>	2.65	39.68	1380000	28.75
<b>D3</b>	2.65	30.70	1160000	26.47
<b>E1</b>	3.53	40.48	1320000	30.67
<b>E2</b>	3.53	12.76	235000	54.30
<b>E3</b>	3.53	43.42	1340000	32.40

Fuente: Elaboración propia

El mayor contenido de lípidos por células de la microalga *Tetraselmis contracta* fue de 54.30 pg/cel, que se encontró en la réplica E2 con un medio de nitrato de 3.53 Mm, sin embargo esta réplica de comportamiento de manera diferentes a todas las demás, por tanto no fue tomada en cuenta en el análisis inferencial. El siguiente tratamiento con mayor contenido de lípidos fue 49.07 pg/cel siendo parte del tratamiento A.

### 3.1.4 Estimación de la producción de biodiesel

Se estimó la producción de biodiesel tomando en cuenta el rendimiento de biodiesel a partir de aceite fresco.

El porcentaje de rendimiento para biodiesel crudo es de 86.6% y para el purificado es del 75%.(Ordoñez *et al.*, 2013), estos pueden variar sin embargo se tomará en cuenta estos datos para estimar el biodiesel como se muestra en la Tabla N° 11.

**Tabla N° 11.** Estimación de la producción de diesel

U. de tratamiento	Lípidos de cultivo mg/l	Volumen en ml (d. aceite 0.92kg/l)	<b>BIODIESEL CRUDO - 86.6% rendimiento (ml)</b>	<b>BIODIESEL PURIFICADO - 75% rendimiento (ml)</b>
<b>A1</b>	21.2	23.04	19.96	17.28
<b>A2</b>	10.6	11.52	9.98	8.64
<b>A3</b>	9.18	9.98	8.64	7.48
<b>B1</b>	22.92	24.91	21.57	18.68
<b>B2</b>	21.78	23.67	20.50	17.76
<b>B3</b>	25	27.17	23.53	20.38
<b>C1</b>	31.82	34.59	29.95	25.94
<b>C2</b>	42.08	45.74	39.61	34.30
<b>C3</b>	42.72	46.43	40.21	34.83
<b>D1</b>	23.98	26.07	22.57	19.55
<b>D2</b>	39.68	43.13	37.35	32.35
<b>D3</b>	30.7	33.37	28.90	25.03
<b>E1</b>	40.48	44.00	38.10	33.00
<b>E2</b>	12.76	13.87	12.01	10.40
<b>E3</b>	43.42	47.20	40.87	35.40

Fuente: Elaboración propia

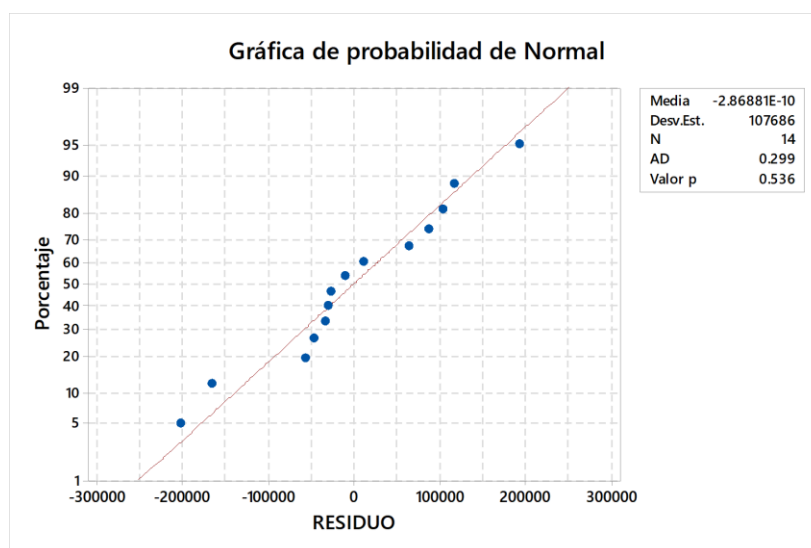
La mayor producción de biodiesel según la estimación fue de 35.40ml por litro de cultivo en el tratamiento E y el menor fue de 7.48ml por litro de cultivo en el tratamiento A.

## 3.2 Análisis inferencial

### 3.2.1 Densidad celular

La prueba estadística de normalidad de residuos comprueba el supuesto de que los residuos están distribuidos normalmente.

Según la gráfica de probabilidad normal de residuos, los datos de la densidad celular (cel/ml) presentan una distribución normal, obteniendo un p valor igual a 0.536.



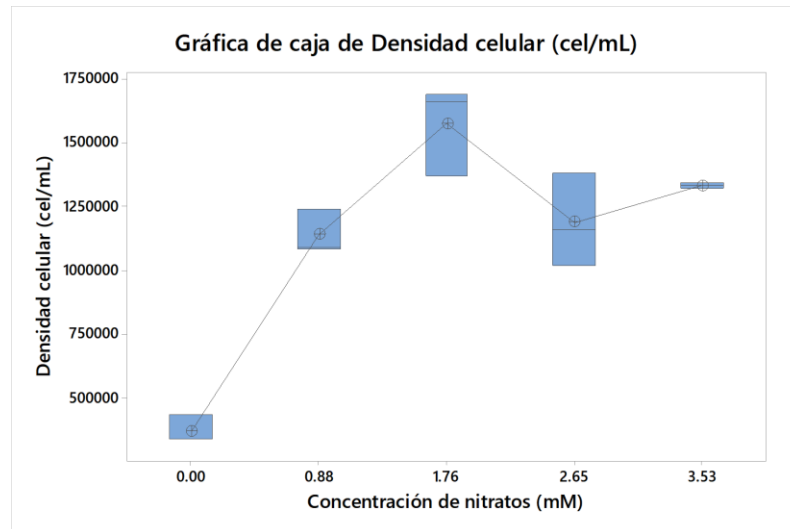
**Gráfica N° 6.** Prueba de normalidad de residuos–Densidad celular (cel/ml). Fuente: Elaboración propia, Minitab 18.

Cumpliendo con el supuesto de normalidad de residuos se aplica el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, obteniendo un p valor de menos a 0.05 con un nivel de confianza del 95%, rechazando la hipótesis nula, la cual postula que las medias no son significativamente diferentes.

**Tabla N° 12.** Análisis de varianza – Densidad celular (cel/ml)

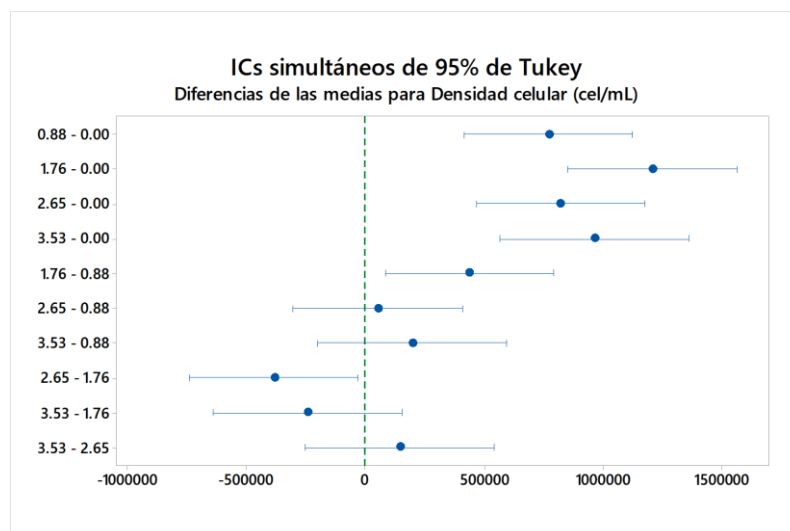
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C. de nitratos (mM)	4	2.41176E+12	6.02941E+11	36.00	0.000
Error	9	1.50752E+11	16750222222		
Total	13	2.56252E+12			

Fuente: Elaboración propia



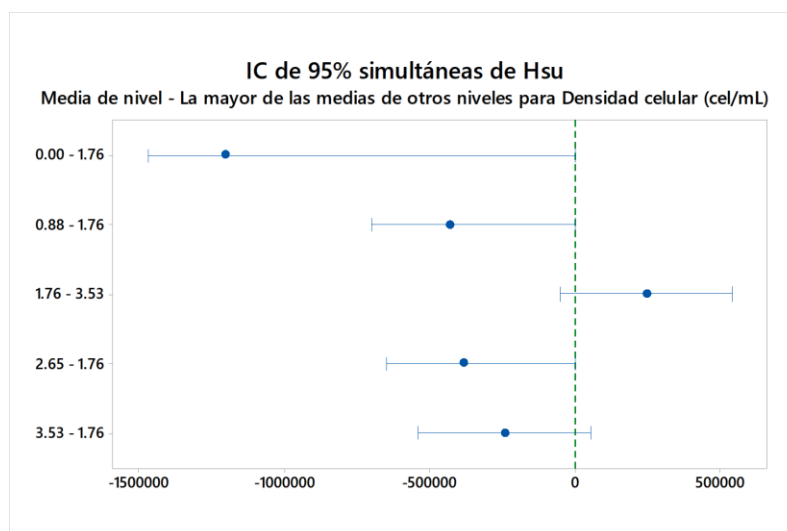
**Gráfica N° 7.** Gráfica de Concentración de nitrato vs. Densidad celular.  
Fuente: Elaboración propia

Para determinar las medias con diferencia significativa se utilizó la prueba post hoc de Tukey obteniendo que las medias de las concentraciones 1.76 y 3.53 mM no son significativamente diferentes al igual que las concentraciones de 0.88, 2.65 y 3.53 mM, sin embargo se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones de 0 mM y todas las demás concentraciones.



**Gráfica N° 8.** Comparación por método Tukey – Densidad celular.  
Fuente: Elaboración propia.

Se realizó el método MCB (Comparaciones múltiples con el mejor) de Hsu, y se determinó que el nivel óptimo de concentración de nitrato fue de 1,76 mM, sin embargo no se encontró diferencia significativa con la concentración de 3.53 mM.



**Gráfica N° 9.** Método MCB de Hsu - Densidad celular. Fuente: Elaboración propia.

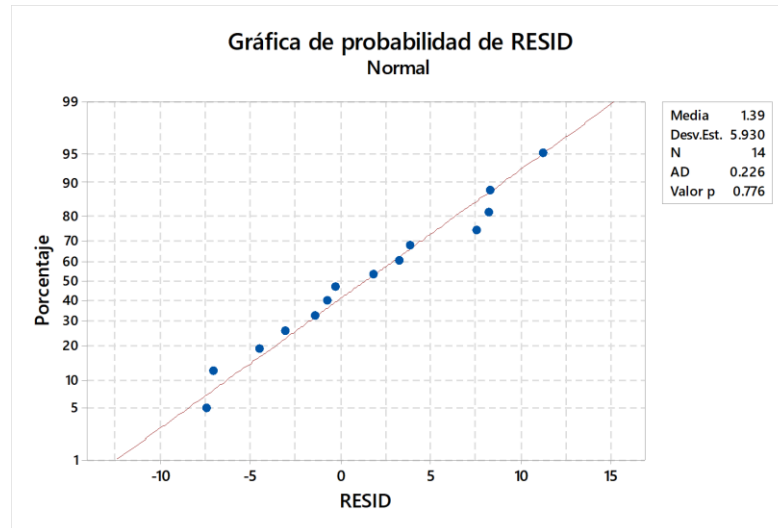
### 3.2.2 Concentración de lípidos

La prueba estadística de normalidad de residuos comprueba el supuesto de que los residuos están distribuidos normalmente.

Según la gráfica de probabilidad normal de residuos, los datos de la concentración de lípidos ( $\mu\text{g/ml}$ ) en las diferentes concentraciones de nitrato presentan una distribución normal, obteniendo un p valor igual a 0.776.

Cumpliendo con el supuesto de normalidad de residuos se aplica el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, obteniendo un p valor de 0.002 con un nivel de confianza del 95%, rechazando la hipótesis nula la cual postula que las medias no son significativamente diferentes.





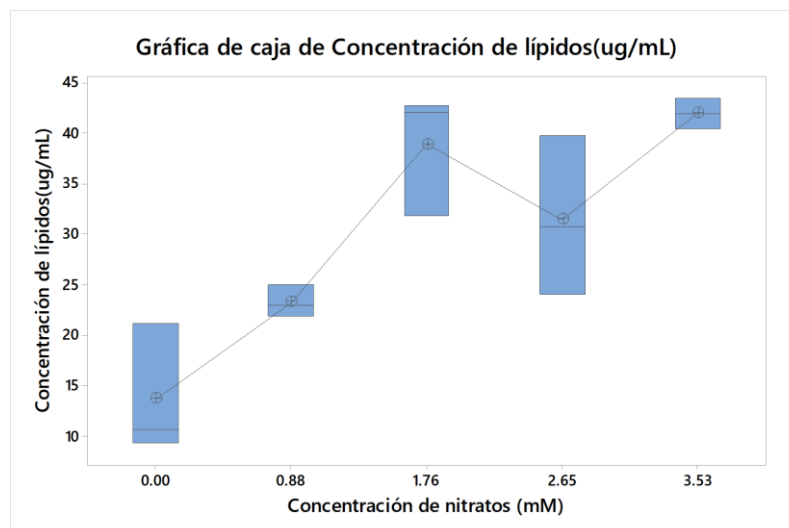
**Gráfica N° 10.** Prueba de normalidad de residuos – Concentración de lípidos ( $\mu\text{g/ml}$ ). Fuente: Elaboración propia.

Se aplica el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, obteniendo un p valor de 0.002 con un nivel de confianza del 95%, rechazando la hipótesis nula, la cual postula que las medias no son significativamente diferentes.

**Tabla N° 13.** Análisis de varianza – Concentración de lípidos ( $\mu\text{g/ml}$ )

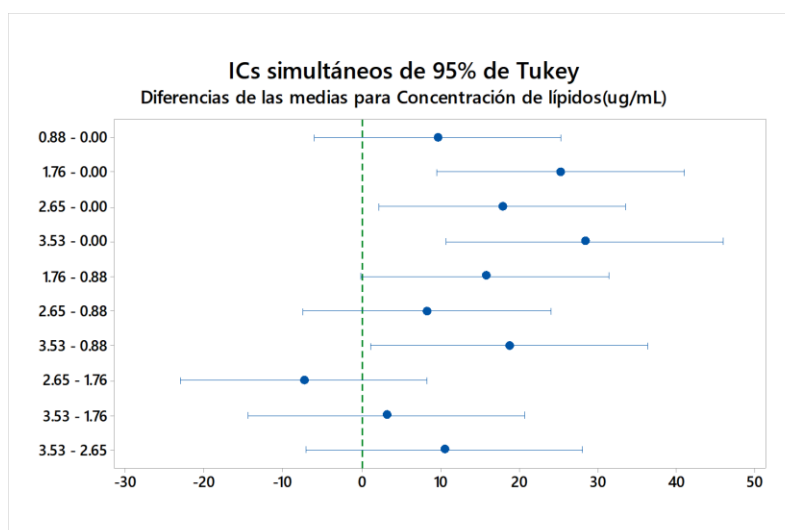
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
<b>C.de nitratos (mM)</b>	4	1451.6	362.90	11.08	0.002
<b>Error</b>	9	294.9	32.76		
<b>Total</b>	13	1746.5			

Fuente: Elaboración propia.



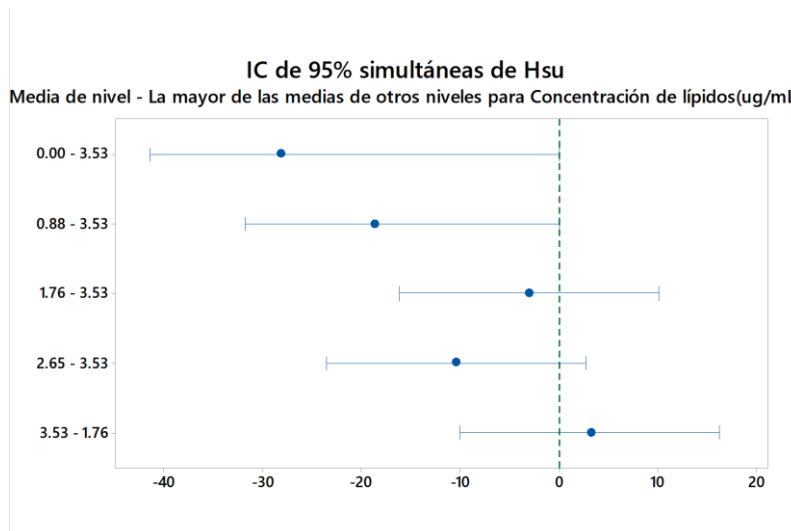
**Gráfica N° 11.** Grafica de concentración de nitrato (mM) vs. Concentración de lípidos ( $\mu\text{g/ml}$ ). Fuente: Elaboración propia.

Se aplicó la comparación de las medias por el método de Tukey, obteniendo que las concentraciones 1.76. 2.65 y 3.53 mM no son significativamente diferentes al igual que las concentraciones de 0.88, 2.65 y 3.53mM, sin embargo se encontró una diferencia significativa entre las concentraciones de 0 y todas las demás concentraciones en excepción con la concentración 0.88 mM.



**Gráfica N° 12.** Comparación por el método de Tukey – Concentración de lípidos ( $\mu\text{g/ml}$ ). Fuente: Elaboración propia

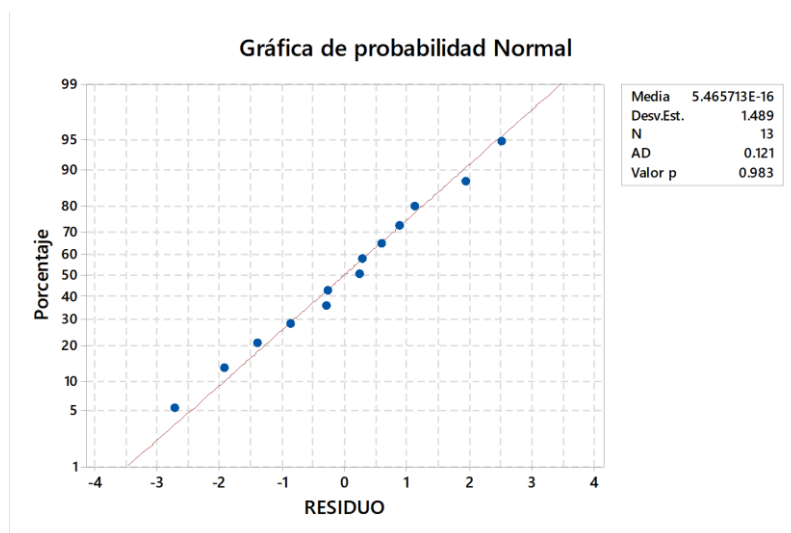
Aplicando el método MCB de HSU, se determinó que el nivel óptimo de nitrato para la concentración de lípidos fue de 2.53 mM, sin embargo no existe diferencia significativa con las concentraciones de 1.76 mM y 2.65 mM de nitrato.



**Gráfica N° 13.** Método MCB de Hsu - Concentración de lípidos Fuente: Elaboración propia

### 3.2.3 Contenido lipídico celular (pg/cel)

La prueba de normalidad de residuos para el contenido de lipídico celular (pg/cel), tuvo un p valor de 0.983, aceptando el supuesto necesario para la aplicación del análisis de varianza.



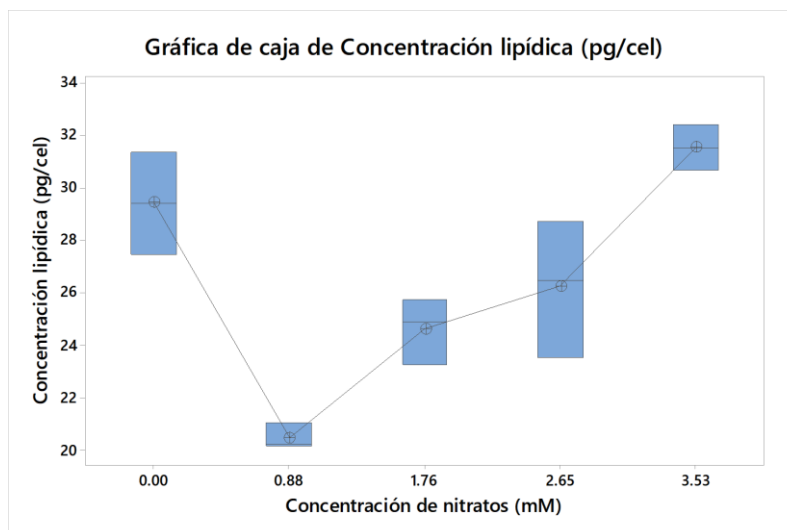
**Gráfica N° 14.** Prueba de normalidad de residuo – contenido lipídico celular (pg/cel). Fuente: Elaboración propia.

Aplicando el análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor, se obtuvo un p valor de 0.001 con un nivel de confianza del 95%, rechazando la hipótesis nula, la cual postula que las medias no son significativamente diferentes.

**Tabla N° 14.** Análisis de varianza – Contenido lipídico celular

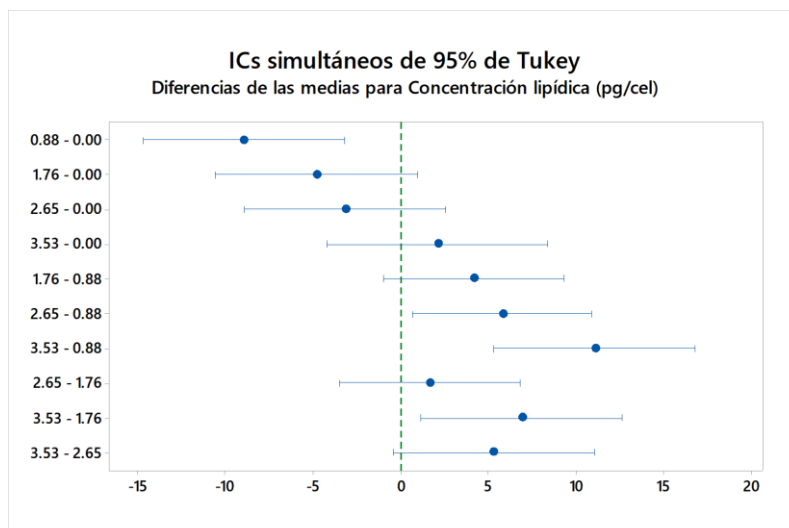
Fuente	GL	SC Ajust.	MC Ajust.	Valor F	Valor p
C. de nitratos (mM)	4	182.59	45.646	13.73	0.001
Error	8	26.60	3.325		
Total	12	209.19			

Fuente: Elaboración propia



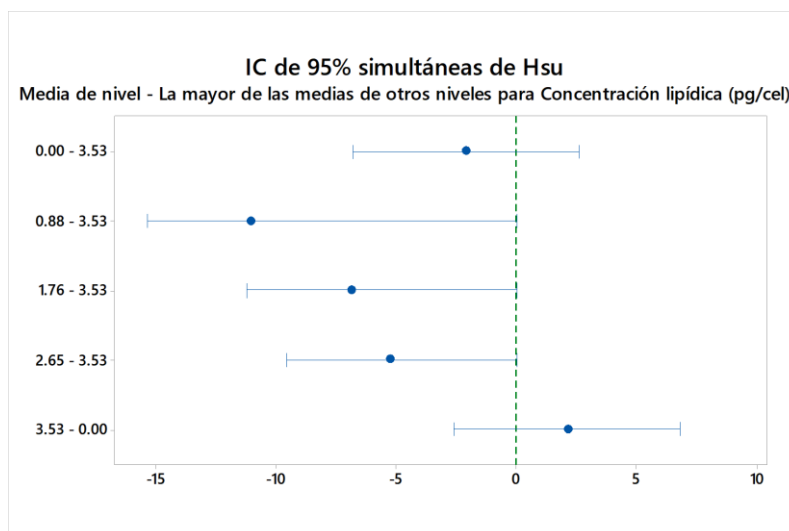
**Gráfica N° 15.** Concentración de nitratos (mM) vs. Contenido lipídico celular (pg/cel). Fuente: Elaboración propia.

Se aplicó el método de Tukey para la comparación de medias obteniendo que existe diferencia significativa entre 0 y 0.88 mM, y también entre 0.88 y las medias de 1.76 y 2.65 mM



**Gráfica N° 16.** Comparación por el método de Tukey – Contenido lipídico celular ( $\mu\text{g/ml}$ ). Fuente: Elaboración propia

Finalmente se aplicó el método MCB de HSU para las comparaciones con la media de los mejores niveles, y se determinó que el nivel óptimo de concentración de nitrato fue de 3.53, sin embargo no existe diferencia significativa con el 0 mM.



**Gráfica N° 17.** Método MCB de Hsu – Contenido lipídico celular (pg/cel). Fuente: Elaboración propia

#### IV. DISCUSIÓN

El crecimiento de las microalgas según su compartimento metabólico depende de las condiciones de cultivo a la que están inmersas, por ello la disminución o aumento de algunos factores y parámetros medio ambientales pueden cambiar o alterar su crecimiento y composición bioquímica. Diferentes estudios concluyen que a mayor cantidad de nitrato en el medio de cultivo genera el aumento la tasa de crecimiento y por tanto la obtención de mayor densidad celular sin embargo algunas investigaciones reportaron que el exceso de fuentes de nitrógeno puede disminuir el crecimiento celular (Park et al.,2010), bajo ese contexto la microalga *Tetraselmis contracta* tuvo una relativa tendencia de crecimiento a mayor concentración de nitrato evaluada desde un valor 0mM a un valor máximo 3.53mM, obteniendo la mayor densidad celular a los 1.76 mM de nitrato (NaNO<sub>3</sub>), sin embargo no existe diferencia significativa con las concentraciones de 2.56 y 3.53 mM de nitrato, cumpliendo con la primero hipótesis planteada.

La eliminación de nitrato como fuente de nitrógeno en el medio de cultivo para muchos investigadores es la más efectiva facilitación de lípidos y carbohidratos siendo ampliamente explorado esta alteración para diferentes especies de microalgas con el objetivo de su potencial uso en biocombustible (Fernandez, 2013 y Prochakova et al., 2013), esta tendencia se reflejó también en la presenta investigación con la especie microalga *Tetraselmis contracta*, al contener mayor contenido lipídico por unidad celular cuando no se le agregó nitratos al medio de cultivo, sin embargo otras investigaciones reportaron que en algunas especies del género *Chlorella*, la deficiencia de este macronutriente tuvo como efecto la acumulación de almidón sin tener alguna interacción con el contenido de lípidos (Illman et al., 2000 y Branyikova et al, 2011), y en los peores casos se reportó que la disminución de nitrato relacionada con alta intensidad de luz disminuyó el contenido de lípidos como en el caso de la microalga *Haematococcus pluvilis* (Damiani et al., 2010).

## V. CONCLUSION

- La mayor densidad celular (cel/ml) de la microalga *Tetraselmis contracta* se obtuvo en el medio de cultivo con concentraciones de 1.76mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), sin embargo no existe diferencia significativa con la concentración de 3.53mM.

En el tratamiento de 1.76mM de nitrato, el valor promedio densidad celular fue de  $1.57 \times 10^6$  cel/ml, mientras que en el tratamiento 3.53Mm fue de  $1.41 \times 10^6$  cel/ml.

- El mayor contenido de lípidos por volumen de cultivo ( $\mu\text{g/ml}$ ) se obtuvo en el cultivo en el medio de cultivo con concentración de 3.53mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), sin embargo no existe diferencia significativa con las concentraciones 1.76 y 2.65mM.

En el tratamiento 3.53mM de nitrato, el valor promedio de contenido de lípidos por volumen de cultivo fue de 41.95  $\mu\text{g/ml}$  mientras que en el tratamiento de 1.76mM fue de 38.87  $\mu\text{g/ml}$ .

- El mayor contenido lipídico celular (pg/cel) de la microalga *Tetraselmis contracta* se obtuvo en el medio de cultivo con concentración de 3.53mM de nitrato ( $\text{NaNO}_3$ ), sin embargo no existe diferencia significativa de con 0mM.

En el tratamiento con 3.53mM de nitrato, el valor promedio de contenido lipídico celular fue de 31.53 pg/cel, mientras que en el tratamiento de 0mM fue de 29.42 pg/cel

- En cuanto al contenido lipídico la réplica E2 del tratamiento con 3.53mM de concentración de nitrato( $\text{NaNO}_3$ ) fue la que obtuvo el mayor valor de contenido lipídico por célula de la microalga *Tetraselmis contracta* (54.30 pg/cel), sin embargo se desconoce el motivo de porque en esta réplica del tratamiento E presento un estadio totalmente diferente.

- Una estimación de biodiesel tomando como referencia datos de rendimiento de producción se obtuvo en el tratamiento E la mayor producción de diesel con una generación promedio de 34.2 ml / L de cultivo, sin embargo al no ser significativamente diferente al tratamiento C según el análisis estadístico esta sería la mejor producción con un promedio de 31.69 ml /L de cultivo con menor requerimiento de nitrato.

## VI. RECOMENDACIÓN

Se recomienda que al estudiar a la microalga *Tetraselmis contracta*, se tome en cuenta que cuando se realice su conteo diario también se las visualice sin utilizar el fijador (lugol) para observar si se encuentran en movimiento debido a que existe fases del ciclo de vida de esta microalga en la que pierden sus flagelos lo cual detiene su crecimiento., también hay que asegurarse que la cepa utilizada para inocular no cuente con diferentes estadios de vida juntos porque esto retrasara el tiempo de estudio.

Como parte de los resultados obtenidos se recomienda que se haga un análisis del perfil de ácidos grasos de los lípidos producidos por la microalga *Tetraselmis Contracta* tomando en cuenta los diferentes niveles de concentraciones estudiados, pudiendo así saber la calidad del biodiesel que se puede producir tomando en cuenta las normas ASTM que establece especificaciones para el biodiesel

Para esta microalga recomienda la utilización de medios sin agregados de nitratos para cuando se quiere estudiar con un enfoque de utilización en industrias específicas de fabricación de biodiesel y solo centrarse en mejorar su reproductividad, haciendo tratamientos de estrés continuo.

Por último se recomienda que se estudie a la microalga *Tetraselmis contracta* bajo un me de cultivo con porcentajes de aguas residuales de preferencia de procedencia de insdustrias como la agricultura, piscicultura y domésticos que por lo generar tienen características de contener mayor contenido de nutrientes, debido que bajo este estudio se comprobó de que resiste altas concentraciones de nitrato mayores a los establecidos por el ECA de agua, además varios estudios indican que las microalgas tienen la capacidad de utilizar los nutrientes de aguas residuales (Xu et al., 2006, Kim et al., 2006 y Park et al., 2010), siendo esta una estrategia para disminuir el costo de cultivo y reducir la contaminación ambiental de diversas fuentes de efluentes con contenido altos de nitrato.



## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTÓN, Almudena; LIZASO, Jesús. Nitritos, nitratos y nitrosaminas. Fundación Ibérica para la Seguridad Alimentaria. Madrid, España, 2001.
- CHEN M, TANG H, MA H, HOLLAND TC, NG S. K.Y, SALLEY S. Effect of nutrients on growth and lipid accumulation in the green algae *Dunaliella tertiolecta*. *Bioresour Technol.* 2011b;102(2):1649-1655.
- CHISTI, Yusuf. Constraints to commercialization of algal fuels. *J Biotechnol* 2013;167:201–14.
- CHI, Lei, YAO, Changhong, CAO, Xupeng y XUE, Song. Coordinated regulation of nitrogen supply mode an initial cell density for energy storage compounds production with economized nitrogen utilization in a marine microalga *Isochrysis zhangjiangensis*. *Bioresource Technology*, 2015.
- CHOJNACKA, Katarzyna y MARQUEZ, Facundo. Kinetic and stoichiometric relationships of the energy and carbon metabolism in the culture of microalgae. *Biotechnol.* 2004;3(1):21-34
- COBOS, M, PAREDES, JD y CASTRO, JC. Inducción de la producción de lípidos totales en microalgas sometidas a estrés nutritivo. *Acta biol. Colomb.* 2016;21(1):17-26.
- CONVERTI, A. et al. Effect of temperatura and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem Eng Process.*2009, 48(6): 1146-1155
- DAMIANI MC, POPOVICH CA, CONSTENLA D, LEONARDI P. Lipid analysis in *Haematococcus pluvialis* to assess its potential use as a biodiesel feedstock. *Bioresour Technol.* 2010;101(11):3801-3807.

- EVERITT, B. S. The Cambridge Dictionary of Statistics. Cambridge University Press. U.K., 1998. 360 pp.
  
- FERNANDES, B., TEIXEIRA, J., DRAGONE, G., VICENTE, A.A., KAWANO, S., BISOVA, K., PRIBYL, P., ZACHLEDER, V., VITTOVA, M. Relationship between starch and lipid accumulation induced by nutrient depletion and replenishment in the microalga *Parachlorella kessleri*. *Bioresource Technol*, 2013. 144, 268-274
  
- HERNÁNDEZ, R., FERNÁNDEZ, C. Y BASPITSTA, P. Metodología de la investigación. 6ªed. México DF: McGRAW-HILL, 2014. 600pp.  
ISBN: 978 1 4562 2396 0
  
- FOGG, G.E. and THAKE, B. Algae Cultures and Phytoplankton Ecology. The University of Wisconsin Press, 1987. 273pp.
  
- FOLCH, J., LEES, M. y Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*, 1957. 226, 497-509.
  
- GAO, Yingying, YANG, Maochun y WANG, Changhai. Nutrient deprivation enhances lipid content in marine microalgae. *Nanjing, China: Bioresource Technology*, 2013, 147, 484-491, 2013. 8pp.
  
- GRINNELL, R., WILLIAMS, M. y UNRAU, Y. Research Method for BSW Students. 8ªed. Pair Bond Publications, 2009.  
ISBN 10: 0981510000
  
- GUILLARD, R.R.L.. Division rates. In: Stein, J.R. (Ed.), *Handbook of Phycological Methods: Culture Methods and Growth Measurements*. Cambridge University Press, Cambridge, 1973. pp. 289–311.
  
- ILLMAN AM, SCRAGG AH, SHALES SW. Increase in *Chlorella* strains calorific values when grown in low nitrogen medium. *Enzyme Microb Technol*. 2000;27(8):631-635.

- IVERSON, S., LANG, S., COOPER, M. Comparison of the Bligh and Dyer and Folch methods for total lipid determination in a broad range of marine tissue (2001). *Lipids*. Vol 36, N° 11, 1283-1287. 2001.
- LARDON, L., HELIAS, A., SIALVE, B., STEYER, J y BERNARD, O. Life-cycle assessment of biodiesel production from microalgae. *Environ Sci Technol*, 2009. 43(17):6475-6481
- MATA, TM., MARTINS AA., CAETANO, NS. Microalgae for biodiesel production and other applications: Areviw. *Renew Sust Energ Rev*, 2010. 14(1):217-232.
- MILLÁN, Aarón, TORRES, Luis, FERNÁNDEZ, Luis. Simultaneous effect of nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentration, carbon dioxide (CO<sub>2</sub>) supply and nitrogen limitation on biomass, lipids, carbohydrates and proteins accumulation in *Nannochloropsis oculata*. *Biofuel Research Journal* 5, 2015. 215-221.
- PALIWAL, Chetan et.al. Abiotic stresses as tools for metabolites in microalgae. Gujarat, India: Bioresource Technology, 2017. 45pp. ISSN: 0960 8524
- PARK, J.B.K., CRAGGS, R.J. and SHILTON, A.N. Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology*, 2010. (102), 35-42.
- PROCHÁZKOVÁ, G., BRÁNYIKOVÁ, I., ZACHLEDER, V., BRÁNYIK, T. Effect of nutrient supply status on biomass composition of eukaryotic green microalgae. *J. Appl. 2013 Phycol.*, 26, 1359-1377
- PRAVEENKUMAR R, SHAMEERA K, MAHALAKSHMI G, AKBARSHA MA, THAJUDDIN N. Influence of nutrient deprivations on lipid accumulation in a dominant indigenous microalga *Chlorella* sp., BUM11008: Evaluation for biodiesel production. *Biomass Bioenergy*. 2012;37:60-66.

- RODOLFI, L, et al. Microalgae for oil: strain selection, induction of lipid synthesis and outdoor mass cultivation in a low-cost photobioreactor. *Biotechnol Bioeng* 209; 102(1):100-112
- PANCHA, Imran, CHOKSHI, Kaumeel, GEORGE, Basil, GHOSH, Tonmoy, PALIWAL, Chetan. Nitrogen stress triggered biochemical and morphological changes in the microalgae *Scenedesmus* sp. CCNM 1077. *Bioresource Technology*, 2014. 146-154
- RASHID, U., ANWAR, F., KNOTHE, G. Evaluation of biodiesel obtained from cottonseed oil. *Fuel Processing Technology*, 2009. 90: 1157-1163.
- SHEN, Ying, PEI, Zhijian, YUAN, Wenqiao, MAO, Entong. Effect of nitrogen and extraction method on algae lipid yield. *Int J Agric & Biol Eng*, 2009; 2(1): 51
- SHIN, et.al. Multilateral approach on enhancing economic viability of lipid production from microalgae: A review. Republic of Korea: *Bioresource Technology*, 2018. 36pp.
- SALOUA, F., SABER, C.I., HEDI, Z. Methyl ester of *Maclurapomifera* (Rafin.) Schneider seed oil: Biodiesel production and characterization. *Bioresource Technology*, 2010. 101: 3091-3096
- SINGH, Ram, PANDEY, Ashok y GNANSOUNOU, Edgar. *Biofuels: production and futures perspectives*. Boca Raton: Taylor & Francis Group, 2017.  
ISBN: 978 1 4987 2359 6
- STEPHENSON, Anna, DENNIS, John, HOWE, Christopher, SCOTT, Stuart y SMITH, Allison. Influence of nitrogen-limitation regime on the production by *Chlorella vulgaris* of lipids for biodiesel feedstocks. *Biofuel*, 2010. 1(1), 47 – 58

- WAN, Yue. Microalgae as the Third Generation Biofuel: Production, Usage, Challenges and Prospects. Master thesis in Sustainable Development. Uppsala, Suecia: Uppsala University, No. 166, 2013. 31pp.
- WU, Hongqin, MIAO, Xiaoling. Biodiesel quality and biochemical changes of microalgae *Chlorella pyrenoidosa* and *Scenedesmus obliquus* in response to nitrate levels. *Bioresource Technology*, 2014. 31pp.
- XIN L, HONG-YING H, KE G, YING-XUE S. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus* sp. *Bioresour Technol.* 2010c;101(14):5494-54500.
- YEH, Kuei-Ling y CHANG, Jo-Shu. Nitrogen starvation strategies and photobioreactor design for enhancing lipid content and lipid production of a newly isolated microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31: Implications for biofuels. *Biotechnology Journal*, 6(11), 1358-1366

## ANEXOS

### ANEXO 1. Instrumento de recolección de datos – Registro de conteo celular

#### REGISTRO DEL CONTEO CELULAR DIARIO

Fecha: \_\_\_\_\_

Unidades de tratamiento	CONTEO	Cuadrante de la cámara de Neubauer				SUMA	Promedio	Densidad celular (ccL/ml)
		1er	2do	3er	4to			
A1	Primero							
	Segundo							
A2	Primero							
	Segundo							
A3	Primero							
	Segundo							
B1	Primero							
	Segundo							
B2	Primero							
	Segundo							
B3	Primero							
	Segundo							
C1	Primero							
	Segundo							
C2	Primero							
	Segundo							
C3	Primero							
	Segundo							
D1	Primero							
	Segundo							
D2	Primero							
	Segundo							
D3	Primero							
	Segundo							
E1	Primero							
	Segundo							
E2	Primero							
	Segundo							
E3	Primero							
	Segundo							

**ANEXO 2.** Instrumento de recolección de datos – Registro de lípidos totales

**REGISTRO DE LOS LÍPIDOS TOTALES**

Fecha: \_\_\_\_\_

UNIDADES DE TRATAMIENTO	PESO DEL VIAL	PESO DEL VIAL MÁS LOS LÍPIDOS	LÍPIDOS TOTALES	CONCENTRACION DE LÍPIDOS
A1				
A2				
A3				
B1				
B2				
B3				
C1				
C2				
C3				
D1				
D2				
D3				
E1				
E2				
E3				

### ANEXO 3. Informe de resultados de lípidos totales



**INSTITUTO DEL MAR DEL PERÚ**

Área Funcional de Investigaciones en Acuicultura

**LABORATORIO DE ANALISIS INSTRUMENTAL**

**INFORME DE RESULTADOS: N° 04/2018**

Solicitante: Srta. Angie Elizabeth Allende Usaqui  
Muestras: Cinco (05) muestras de cultivo de microalgas  
Servicio: TUSNE N° 8: Ensayo de Lípidos en Microalgas  
Fecha de recepción: 05/07/2018  
Fecha de entrega de resultados: 10/07/2018

---

#### Resultados

En la página 02

Atentamente,

Quim. Leenin Flores Ramos  
Responsable del Laboratorio de  
Análisis Instrumental  
N° CQP: 1107  
Correo: [lflores@imarpe.gob.pe](mailto:lflores@imarpe.gob.pe)  
Teléfono: (051) 208-8650 anexo: 845






## PROCEDIMIENTO

La extracción de los lípidos fue realizado mediante el método de Folch (1957), que consistió en mezclar el pellet de 50 mL de cultivo microalgas con una solución de cloroformo:metanol 2:1. Se usó un baño de ultrasonido Branson 2510 para mejorar la extracción de lípidos. la fase de cloroformo:lipidos fue separada con KCl 0.88% y evaporada con nitrógeno gas para obtener el peso de los lípidos por gravimetría en una microbalanza Sartorius MSA6.6S-000-DM. Los resultados se expresaron como concentración de lípidos ( $\mu\text{g/mL}$ ). 1

## RESULTADOS

Tabla 1. Resultados de la concentración de lípidos en las muestras.



Código de Muestra	Lípidos ( $\mu\text{g/mL}$ )
A (Rep1)	21.20
A (Rep2)	10.60
A (Rep3)	9.18
B (Rep1)	22.92
B (Rep2)	21.78
B (Rep3)	25.00
C (Rep1)	31.82
C (Rep2)	42.08
C (Rep3)	42.72
D (Rep1)	23.98
D (Rep2)	39.68
D (Rep3)	30.70
E (Rep1)	40.48
E (Rep2)	12.76
E (Rep3)	43.42

Rep. Réplica.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Folch, J., Lees, M. y Sloane Stanley, G.H. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *The Journal of biological chemistry*. 226, 497-509.

#### ANEXO 4. Acta de aprobación de originalidad de tesis

 <b>UCV</b> UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO	<b>ACTA DE APROBACIÓN DE ORIGINALIDAD DE TESIS</b>	Código : F06-PP-PR-02.02 Versión : 09 Fecha : 11-06-2018 Página : 1 de 1
--	--	---

Yo, Juan Alberto Peralta Medina, docente de la Facultad de Ingeniería y Escuela Profesional de Ingeniería de la Universidad César Vallejo – Lima Norte, revisor de la tesis titulada:

**"Evaluación del contenido lipídico de la microalga Tetraselmis contracta ante diferentes concentraciones de nitrato como nutriente para su potencial uso como biodiesel"**, de la estudiante **Angie Elizabeth Allende Usaqui**, constato que la investigación tiene un índice de similitud de 6% verificable en el reporte de originalidad del programa Turnitin.

El suscrito analizó dicho reporte y concluyó que cada una de las coincidencias detectadas no constituyen plagio. A mi leal saber y entender la tesis cumple con todas las normas para el uso de citas y referencias establecidas por la Universidad César Vallejo.

Los Olivos, 10 de setiembre de 2018



Juan Alberto Peralta Medina  
DNI: 09127909

Elaboró	Dirección de Investigación	Revisó	Representante de la Dirección / Vicerrectorado de Investigación y Calidad	Aprobó	Rectorado
---------	----------------------------	--------	---	--------	-----------

# ANEXO 5 . Imagen de Turnitin

The screenshot displays the Turnitin Feedback Studio interface. At the top, the browser address bar shows the URL: <https://ev.turnitin.com/app/carta/es/?o=999618933&s=38u=1052820543&l=ang=es>. The page title is "Evaluación del contenido lipídico de la microalga Tetraselmis contracta a". The document being evaluated is titled "Evaluación del contenido lipídico de la microalga Tetraselmis contracta a ante diferentes concentraciones de inóculo como nutrientes, para su potencial uso como bioalimento, 2018". The document is from the Universidad César Vallejo, Facultad de Ingeniería, Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental. The author is Angélica Elizabeth Allende Isaqui, and the advisor is Mg. Ine. Juan Alberto Peralta Medina. The document is from the Instituto de Investigación en Calidad y Gestión de los Recursos Naturales, Lima - Perú, 2018. The Turnitin report shows a 6% similarity score. The sources are listed as follows:

Rank	Source	Similarity Score
1	repositorio.ucv.edu.pe Fuente de Internet	3 %
2	lib.dr.iastate.edu Fuente de Internet	1 %
3	pirhua.udep.edu.pe Fuente de Internet	1 %
4	www.revistas.unal.edu.... Fuente de Internet	1 %
5	www.redalyc.org Fuente de Internet	<1 %

The interface also includes a navigation bar with icons for home, check, edit, grid, and a red notification bubble with the number 6. The bottom of the page shows the page number "Página: 1 de 73" and the word count "Número de palabras: 12243". The Turnitin logo and "Activado" status are also visible.



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FORMATO DE SOLICITUD

SOLICITA:

Digitización de Tesis

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL

Angie Elizabeth Allende Usaqui con DNI N° 70982613 domiciliado (a) en St.1 Gr.13 Mz. O Lt.24 - VES ante Ud. Con el debido respeto, expongo lo siguiente:

Que en mi condición de alumno de la promoción 2018-I del programa ...INGENIERÍA AMBIENTAL... Identificado con el código de matrícula N° 6700265621 de la Escuela de Ingeniería Ambiental, recorro a su honorable despacho para solicitar lo siguiente:

la digitalización de mi tesis titulada "Evaluación del contenido lipídico de la microalga Tetraelmis contrada ante diferentes concentraciones de nitrato como nutriente, para su potencial uso como biodiesel, 2018"

Por lo expuesto, agradeceré ordenar a quien corresponde se me atienda mi petición por ser de justicia.

[Signature]

Allende Usaqui

Lima, 15 de Agosto de 2018



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

Centro de Recursos para el Aprendizaje y la Investigación (CRAI)  
"César Acuña Peralta"

## FORMULARIO DE AUTORIZACIÓN PARA LA PUBLICACIÓN ELECTRÓNICA DE LAS TESIS

### 1. DATOS PERSONALES

Apellidos y Nombres: (solo los datos del que autoriza)

..... Allende Usagu, Angie Elizabeth

D.N.I. : 70982613

Domicilio : 57.1 Cr. 13 Mz. O. 21.34 - V.E.S

Teléfono : Fijo : Móvil : 921786524

E-mail : eli.fangie29@gmail.com

### 2. IDENTIFICACIÓN DE LA TESIS

Modalidad:

Tesis de Pregrado

Facultad : Ingeniería

Escuela : Ingeniería Ambiental

Carrera : Ingeniería Ambiental

Título : Ingeniería Ambiental

Tesis de Post Grado

Maestría

Grado : .....

Mención : .....

Doctorado

### 3. DATOS DE LA TESIS

Autor (es) Apellidos y Nombres:

..... Allende Usagu, Angie Elizabeth

Título de la tesis: "Evaluación del contenido lipídico de la microalga

Tetraselmis contracta ante diferentes concentraciones de nitrato como  
nutriente para su potencial uso como biodiesel, 2018"

Año de publicación : .....

### 4. AUTORIZACIÓN DE PUBLICACIÓN DE LA TESIS EN VERSIÓN ELECTRÓNICA:

A través del presente documento,

Si autorizo a publicar en texto completo mi tesis.

No autorizo a publicar en texto completo mi tesis.

Firma : .....

..... Allende U.

Fecha : .....

15-08-18