



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE TECNOLOGIA E GEOCIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA CIVIL E AMBIENTAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

MARCELLA VIANNA CABRAL PAIVA

PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS UTILIZANDO
MICROALGAS PARA REMOÇÃO DE NUTRIENTES, MATÉRIA ORGÂNICA
RESIDUAL E PRODUÇÃO LIPÍDICA

Recife
2019

MARCELLA VIANNA CABRAL PAIVA

**PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS UTILIZANDO
MICROALGAS PARA REMOÇÃO DE NUTRIENTES, MATÉRIA ORGÂNICA
RESIDUAL E PRODUÇÃO LIPÍDICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Civil.

Área de concentração: Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Recife

2019

Catálogo na fonte

Bibliotecário Josias Machado da Silva Jr, CRB-4 / 1690

P149p

Paiva, Marcella Vianna Cabral.

Pós-tratamento de efluentes domésticos utilizando microalgas para remoção de nutrientes, matéria orgânica residual e produção lipídica / Marcella Vianna Cabral Paiva– 2019.

164 f., il., tabs., abrev. e sigl.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CTG. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, 2019.

Inclui Referências e anexos.

1. Engenharia Civil. 2. Cultivo de microalgas. 3. Remoção de nutrientes. 4. Remoção de matéria orgânica. Produção lipídica. I. Santos, Maria de Lourdes Florencio dos (Orientador). II. Título.

UFPE

624 CDD (22. ed.)

BCTG/2019-434

MARCELLA VIANNA CABRAL PAIVA

**PÓS-TRATAMENTO DE EFLUENTES DOMÉSTICOS UTILIZANDO
MICROALGAS PARA REMOÇÃO DE NUTRIENTES, MATÉRIA ORGÂNICA
RESIDUAL E PRODUÇÃO LIPÍDICA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Engenharia Civil.

Aprovada em: 15 /02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Maria de Lourdes Florencio dos Santos (Orientadora)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Wamberto Raimundo da Silva Junior (Examinador Externo)
Instituto Federal da Paraíba

Prof.^a Dr.^a Simone Machado Santos (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Elisabeth Amaral Pastich Gonçalves (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a Kenia Kelly Barros da Silva (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

A Deuse à minha família.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me permitiu cumprir mais uma etapa e que me levantou em todos os momentos difíceis, me mostrando o caminho da vitória.

Ao programa de Pós-Graduação em Tecnologia Ambiental e Recursos Hídricos e ao grupo de professores por todos os ensinamentos e pela oportunidade de realização do doutorado.

À professora Lourdinha pelos valiosos ensinamentos, por todas as conversas e conselhos que me ajudaram a acreditar no meu potencial e nunca desistir dos meus objetivos.

À amiga Elisabeth Pastich, que esteve presente em minha vida no mestrado e doutorado, sempre disposta a ensinar, ajudar e sendo uma inspiração de força e determinação. Não esquecerei jamais das coletas em Petrolândia, Rio Formoso e os “perregues” que passamos em Petrolina.

À minha grande amiga Mariana Barbosa, que sempre me apoiou no desenvolvimento do trabalho, ajudou na montagem dos experimentos e na execução das análises (desde os tempos de mestrado) e esteve sempre ao meu lado também no doutorado, me incentivando, me dando força e conselhos.

Ao Laboratório de Engenharia Ambiental (LEA) UNIVASF, principalmente as técnicas Damiana e Micaela, por sempre me apoiar na realização das análises.

À Professora Miriam Cleide Amorim por permitir o uso do Laboratório de Engenharia Ambiental, pela amizade e forte parceria.

Às estagiárias que tanto me ajudaram nesses 4 anos de árduo trabalho, Catiane Oliveira, Bárbara Souza, Patrícia Souza e Thaimara Souza. Obrigada pela dedicação e pelo apoio nas horas mais difíceis.

Aos IC's Paulo e Amanda que tanto me ajudaram na execução de análises no LSA e por todas as ótimas conversas e momentos de descontração.

À minha família, que sempre me apoiou, me incentivou a estudar e a batalhar pelos meus objetivos e torceu pelo meu sucesso. Dedico a vocês todas as minhas conquistas.

Às amigas do LSA Larissa e Poli, por todos esses anos de convivência, parceria e por sempre estarem dispostas a ajudar e escutar os desabafos.

Às amigas Tatiana Calado e Elisabeth Lima que doaram muito do seu tempo para ajudar na conclusão deste trabalho.

À COMPESA por autorizar a realização de coletas na Estação de Tratamento de Esgoto Centro (Petrolina) e utilização dos espaços para o desenvolvimento de pesquisa.

À FACEPE, FINEP, CAPES, CNPq, INCT ETEs Sustentáveis e Fibra Técnica Ltda
pelo apoio ao Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da UFPE.

RESUMO

A utilização de microalgas para o tratamento de águas residuárias e para geração de biomassa viável à produção de lipídios é uma opção atraente em termos de redução dos custos e para que o processo seja sustentável. Partindo dessa concepção, o efluente doméstico de três etapas da Estação de Tratamento de Esgoto- Centro, localizada na cidade de Petrolina-PE, foram utilizados para o cultivo de microalgas, a fim de avaliar o potencial para produção de lipídios e também a remoção de nutrientes e matéria orgânica residual presentes nesses efluentes. Foram realizados quatro experimentos independentes com três espécies de microalgas (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*), avaliando diferentes variáveis: I- inóculo inicial de microalgas em relação ao efluente, II- metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, III- diferentes etapas do tratamento da ETE Centro, IV- efluente com e sem filtração, V- efluente com e sem autoclavagem, VI- redução dos nutrientes ao longo do cultivo e VII- microalgas cultivadas de forma suspensa e imobilizada. Durante o experimento, foram avaliadas a densidade celular, taxa de crescimento, a remoção de DQO, NTK, NH_4^+ e P, conteúdo, percentual de óleo e quantificação de estéres metílicos de ácidos graxos (FAME's). Houve avaliação comparativa através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e teste de Dunn. Na etapa 1 do estudo, o pré-tratamento do efluente com utilização de filtração não reduziu a população de microrganismos predadores e não gerou diferenças significativas quando comparado ao efluente sem filtração; a espécie *D. subspicatus*, nos cultivos autotróficos e mixotróficos apresentou valores mais elevados de densidade celular ($\geq 10^7$ cel/mL), quando comparados ao cultivo heterotrófico (10^6 cel/mL) e provavelmente a densidade mais baixa pode estar relacionada à falta de fonte de carbono orgânico, que não foi suprida pelos compostos existentes no efluente. Na etapa 2, a autoclavagem foi eficaz na redução microrganismos predadores, porém, eliminou também as bactérias heterotróficas, que demonstraram em alguns tratamentos, uma relação mutualística positiva, aumentando a densidade celular, taxa de crescimento e acúmulo de lipídios totais. Na etapa 3, foram avaliadas as densidades e taxas de crescimento das três espécies de microalgas de forma comparativa e a *D. subspicatus* e a *C. vulgaris* destacaram-se no acúmulo de lipídios totais apresentando valores superiores a 30%. Na 4 etapa, a imobilização das microalgas com alginato de cálcio não gerou maiores eficiências na remoção de nutrientes, matéria orgânica residual, como também não apresentou valores mais elevados de acúmulo lipídico, quando comparadas as algas suspensas. O óleo extraído dos cultivos autotrófico com células suspensas e imobilizadas foi caracterizado via CG-MS e os principais FAME's encontrados foram C16:0-C18:0. Em relação às eficiências de remoções de

DQO, NH_4^+ , NTK e P, foram de modo geral elevadas, em todas as etapas, principalmente nos cultivos com metabolismos autotróficos e mixotróficos. Houve remoção total de NH_4^+ , mesmo antes do 7º dia de cultivo e este estresse nutricional esteve correlacionado com maior acúmulo de lipídios por grama de biomassa. O metabolismo mixotrófico apresentou resultados bastante promissores, podendo ser uma alternativa para redução de custos em sistemas integrados de cultivo.

Palavras-chave: Cultivo de microalgas. Remoção de nutrientes. Remoção de matéria orgânica. Produção lipídica.

ABSTRACT

The use of microalgae for wastewater treatment and viable biomass generation for lipid production is an attractive option in terms of cost reduction and for the process to be sustainable. From this conception, the three-stage domestic effluent from the Sewage Treatment Center-Center, located in the city of Petrolina-PE, were used for microalgae cultivation, in order to evaluate the potential for lipid production and also the removal of nutrients and residual organic matter present in these effluents. Four independent experiments were carried out with three microalgae species (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* and *Chlorella vulgaris*), evaluating different variables: I- initial inoculum of microalgae in relation to effluent, II- autotrophic, heterotrophic and myxotrophic metabolism, III- different stages treatment of the WWTP, IV-effluent with and without filtration, V- effluent with and without autoclaving, VI- reduction of nutrients throughout cultivation and VII- microalgae suspended and immobilized. During the experiment, cell density, growth rate, removal of COD, NTK, NH_4^+ and P, content, oil percentage and quantification of fatty acid methyl esters (FAME's) were evaluated. There was comparative evaluation through the nonparametric Kruskal-Wallis test and Dunn's test. In step 1 of the study, the pretreatment of the effluent with filtration did not reduce the population of predatory microorganisms and did not generate significant differences when compared to the effluent without filtration; *D. subspicatus* species, in autotrophic and myxotrophic crops, presented higher cell density values ($\geq 10^7$ cell / mL) when compared to heterotrophic culture (10^6 cell / mL) and probably the lowest density may be related to lack of source organic carbon, which was not supplied by the existing compounds in the effluent. In step 2, autoclaving was effective in reducing predatory microorganisms, but also eliminated heterotrophic bacteria, which demonstrated in some treatments a positive mutualistic relationship, increasing cell density, growth rate and total lipid accumulation. In step 3, the densities and growth rates of the three microalgae species were compared comparatively and *D. subspicatus* and *C. vulgaris* stood out in the accumulation of total lipids with values above 30%. In the fourth step, the immobilization of microalgae with calcium alginate did not generate higher efficiencies in the removal of nutrients and residual organic matter, nor showed higher values of lipid accumulation when compared to suspended algae. The oil extracted from autotrophic cultures with suspended and immobilized cells was characterized via CG-MS and the main FAME's found were C16: 0-C18: 0. Regarding the removal efficiencies of COD, NH_4^+ , NTK and P, they were generally high in all stages, especially in cultures with autotrophic and myxotrophic

metabolism. There was total removal of NH_4^+ even before the 7th day of cultivation and this nutritional stress was correlated with higher lipid accumulation per gram of biomass. Myxotrophic metabolism showed very promising results and may be an alternative for cost reduction in integrated cultivation systems.

Keywords: Microalgae cultivation. Nutrients removal. Organic matter removal. Lipid production.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Esquema da relação entre microalgas e bactérias em um cultivo.....	32
Quadro 1 - Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo com algas suspensas e com algas imobilizadas.....	34
Quadro 2 - Vantagens e desvantagens metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico para produção lipídica.....	38
Figura 2- Esquema da fotossíntese	40
Figura 3- Via das pentoses.....	42
Figura 4 - Esquema do metabolismo mixotrófico	43
Figura 5- Biossíntese de lipídios nas células das microalgas	44
Quadro 3 - Principais ácidos graxos produzidos por espécies de microalgas.	46
Figura 6 - Etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas.	47
Figura 7 - Culturas estoques das espécies de microalgas em desenvolvimento.....	53
Quadro 4 - Análises, unidades e procedimentos analíticos que foram utilizados para caracterização do efluente da ETE Centro, Município de Petrolina. PE.....	55
Figura 8 - Inóculos iniciais de microalgas em relação ao volume total do reator e do efluente utilizado como meio de cultivo.....	57
Figura 9 - Câmera de Neubauer espelhada, esquema de transecto e microscópio óptico.	59
Figura 10 - Microscópio óptico	59
Figura 11- Condições de cultivo da espécie <i>D. Subspicatus</i> na etapa 1 do experimento.....	66
Figura 12 - Condições de cultivo da espécie <i>D. Subspicatus</i> na etapa 2 do experimento.....	67
Figura 13 - Condições de cultivo das espécies de microalgas, <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> na etapa 3 do experimento.	68
Figura 14 - Condições de cultivo das espécies de microalgas, <i>D.subspicatus</i> , <i>S.obliquus</i> e <i>C.vulgaris</i> com células suspensas e imobilizadas na etapa 4 do experimento.	69
Figura 15 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo autotrófico, em efluente com filtração.	72
Figura 16 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com os inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo autotrófico, em efluente sem filtração.	72
Figura 17 - Presença de organismos predadores no cultivo.	73

Figura 18 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20% ,30%, 40% e 50% com metabolismo hetetrotrófico, em efluente com filtração.	75
Figura 19 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com os inóculos iniciais de 5%,10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo heterotrófico, em efluente sem filtração	75
Figura 20 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20% ,30%, 40% e 50% com metabolismo mixotrófico, em efluente com filtração.	78
Figura 21 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20% ,30%, 40% e 50% com metabolismo mixotrófico, em efluente sem filtração.	78
Figura 22 - Concentrações de NTK após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, considerando os cultivos com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	81
Figura 23 - Concentração de $N-NH_4^+$ após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, considerando os cultivos com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	83
Figura 24 - Concentração média de fósforo total após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	85
Figura 25 - Concentração média de DQO após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração e com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	87
Figura 26 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> , nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente autoclavado.	94
Figura 27 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> , nos inóculos iniciais de 5%. 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente não autoclavado.	94
Figura 28 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> , nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo heterotrófico, em efluente autoclavado.	95

Figura 29 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo heterotrófico, em efluente não autoclavado.	95
Figura 30 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> , nos inóculos de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico, em efluente autoclavado.	97
Figura 31 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> , nos inóculos de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico, em efluente não autoclavado.	97
Figura 32. Resultados de NTK após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A), com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos aplicados.	100
Figura 33 - Resultados de N-NH_4^+ após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A), com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicados.	102
Figura 34 - Resultados de P-PO_4^{3-} (fósforo total) após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A) com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicados.	104
Figura 35 - Resultados de remoção DQO após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicados.	106
Figura 36 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente pós-UASB.	109
Figura 37 - Curva de crescimento da espécie <i>S. obliquus</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico, em efluente pós-UASB.	109
Figura 38 - Curva de crescimento da espécie <i>C. vulgaris</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico, em efluente pós-UASB.	110
Figura 39 - Curva de crescimento da espécie <i>D. subspicatus</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.	111
Figura 40 - Curva de crescimento da espécie <i>S. obliquus</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.	111
Figura 41 - Curva de crescimento da espécie <i>C. vulgaris</i> nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.	111

Figura 42 - Resultados de DQO do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo autotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	115
Figura 43 - Resultados de DQO do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo mixotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	115
Figura 44- Resultados de NH_4^+ do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	116
Figura 45 - Resultados de NH_4^+ do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo mixotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	116
Figura 46- Resultados de NTK (mg.L^{-1}) do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	117
Figura 47 - Resultados de NTK (mg.L^{-1}) do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo mixotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	118
Figura 48 - Resultados de fósforo total do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	119
Figura 49 - Resultados de fósforo total do efluente após 7 e 15 dias das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismo mixotrófico, concentrações iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	119
Figura 50 - Algas imobilizadas utilizadas no cultivo	124
Figura 51 - Remoção de DQO do esgoto pós-UASB utilizado para o cultivo das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas e imobilizadas.	125
Figura 52 - Remoção de DQO do esgoto pós-FAS utilizado para o cultivo das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas e imobilizadas.	125
Figura 53 - Remoção de NH_4^+ utilizando o esgoto pós-UASB para o cultivo das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas(S) e imobilizadas (I).	126
Figura 54 - Remoção de NH_4^+ utilizando o esgoto pós-FAZ para o cultivo das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas(S) e imobilizadas (I).	126

Figura 55 -Remoção de NTK utilizando o esgoto pós-UASB, com as espécies <i>D. subpicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas(S) e imobilizadas (I).	127
Figura 56 - Remoção de NTK utilizando o esgoto pós-FAS, com as espécies <i>D. subpicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas(S) e imobilizadas(I).	127
Figura 57 - Remoção de fósforo totalcom esgoto pós-UASB utilizado para o cultivo com as espécies <i>D. subpicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas e imobilizadas.....	128
Figura 58 - Remoção de fósforo total com pós-FAS utilizado para o cultivo com as espécies <i>D. subpicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas e imobilizadas.....	128
Figura 59 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>D. subspicatus</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.	131
Figura 60 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>D. subspicatus</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.	131
Figura 61 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>S. obliquus</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.	131
Figura 62 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>S. obliquus</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.	131
Figura 63 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>C. vulgaris</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.	132
Figura 64 - Quantificação de FAME´s da espécie <i>C. vulgaris</i> suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.	132

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição do meio Provazzoli® adaptado e solução de vitaminas do complexo B	52
Tabela 2 - Dados de projeto da ETE-Centro, Município de Petrolina. PE.....	54
Tabela 3 - Resultados de medições do efluente pós-DS na ETE Centro, Petrolina, PE.	70
Tabela 4 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-DS na ETE centro.	70
Tabela 5 - Taxa de crescimento de <i>D subispicatus</i> nos cultivos autotróficos com inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%,40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.	74
Tabela 6 - Taxa de crescimento de <i>D subispicatus</i> nos cultivos heterotróficos com inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%,40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.	77
Tabela 7 - Taxa de crescimento de <i>D subispicatus</i> no cultivo mixotrófico com inóculos iniciais a 5% 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.	80
Tabela 8 - Eficiência média de remoção de NTK nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.	82
Tabela 9 - Eficiência média de remoção de N-NH ₄ ⁺ nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.	84
Tabela 10 - Eficiência de remoção de P-PO ₄ ³⁻ nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.	86
Tabela 11 - Eficiência média de remoção de DQO nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.	88
Tabela 12 - Percentual de óleo de <i>D.subspicatus</i> inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS. .	89
Tabela 13 - Resultados de medições do efluente pós-FAS na ETE Centro	92
Tabela 14 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-FAS na ETE Centro.	92
Tabela 15 - Taxa de crescimento no cultivo autotrófico, com todas os inóculos iniciais no efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A).	94

Tabela 16 - Taxa de crescimento no cultivo heterotrófico, com todos os inóculos iniciais no efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado.	96
Tabela 17 - Taxa de crescimento no cultivo mixotrófico, com todas as concentrações no efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado.	98
Tabela 18 - Resultado da eficiência de remoção de NTK do efluente pós-FAS, com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado (A) e não autoclavado (N/A) e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	101
Tabela 19 - Resultado da eficiência de remoção N-NH ₄ ⁺ do efluente pós-FAS, com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	103
Tabela 20- Resultado da eficiência de remoção de fósforo total do efluente pós-FAS, após cultivos com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.	105
Tabela 21- Resultado da eficiência de remoção de DQO do efluente pós-FAS, após cultivos com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. ...	107
Tabela 22 - Resultados de medições do efluente pós-UASB na ETE Centro, Petrolina, PE.	108
Tabela 23 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-UASB na ETE Centro.	108
Tabela 24 - Taxas de crescimento do cultivo das espécies <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluentes pós-UASB.	113
Tabela 25 - Percentual de óleo de <i>D. subspicatu</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> com metabolismos autotrófico e mixotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-UASB.	121
Tabela 26 - Características físico-químicas do esgoto doméstico pós-UASB e pós-FAS utilizado para o cultivo das microalgas.	123
Tabela 27 - Conteúdo e percentual de óleo da espécie <i>D. subspicatus</i> , <i>S. obliquus</i> e <i>C. vulgaris</i> suspensas e imobilizadas com o metabolismo autotrófico.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APHA	<i>American Public Health Association</i>
CG-MS	Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massa
COMPESA	Companhia Pernambucana de Saneamento
DCM _{ax}	Densidade Celular Máxima
DCM _{ed}	Densidade Celular Média
DQO	Demanda química de oxigênio
DS	Decantador secundário
ETE	Estação de Tratamento de Esgoto
FAS	Filtro Biológico Aerado Submerso
FAMES	<i>Fatty Acid Methyl Esters</i>
LAPAVI	Laboratório de Produção de Alimento Vivo
LEA	Laboratório de Engenharia Ambiental
LSA	Laboratório de Saneamento Ambiental
UNIVASF	Universidade Federal do Vale do São Francisco
UASB	Reator Anaeróbio de Fluxo Ascendente e Manta de Lodo
<i>lux</i>	Fótons de luz incidente
nm	Nanometro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	26
3.1	CULTIVO DE MICROALGAS	26
3.2	SELEÇÃO DAS ESPÉCIES PARA CULTIVO	27
3.2.1	Gênero <i>Scenedesmus</i>.....	28
3.2.2	Gênero <i>Desmodesmus</i>	28
3.2.3	Gênero <i>Chlorella</i>	29
3.3	CULTIVO DE MICROALGAS COM UTILIZAÇÃO DE ÁGUASRESIDUÁRIAS	30
3.3.1	Interferência de organismos predadores no cultivo de microalgas com esgoto doméstico	31
3.3.2	Cultivo com células suspensas e imobilizadas	33
3.3.3	Fatores influentes no cultivo de algas	35
3.3.3.1	Nutrientes (N e P)	35
3.3.3.2	Temperatura	35
3.3.3.3	pH	36
3.3.3.4	Gás carbônico	37
3.3.3.5	Oxigênio dissolvido	37
3.3.3.6	Iluminação	38
3.3.4	Metabolismo das microalgas.....	38
3.3.4.1	Metabolismo autotrófico.....	40
3.3.4.2	Metabolismo heterotrófico.....	41
3.3.4.3	Metabolismo mixotrófico	42
3.4	BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS NAS MICROALGAS.....	43
3.5	ETAPAS PARA PRODUÇÃO LIPÍDICA A PARTIR DE MICROALGAS	46
3.5.1	Métodos de colheita e secagem das microalgas	47
3.5.2	Métodos de extração de óleo	49
4	METODOLOGIA.....	51
4.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	51

4.2	DETALHAMENTO DAS ETAPAS PRELIMINARES	52
4.2.1	Desenvolvimento da “cultura estoque”	52
4.2.2	Caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo.....	53
4.3	REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS EM REATORES	55
4.3.1	Avaliação do metabolismo	55
4.3.2	Inóculo inicial de microalgas	56
4.3.3	Diferentes tipos de efluentes utilizados no cultivo	57
4.3.4	Avaliação da interferência da presença microrganismos predadores no cultivo	57
4.3.5	Redução da concentração de nutrientes no efluente utilizado como meio de cultivo.....	58
4.3.6	Células suspensas e imobilizadas.....	58
4.4	MONITORAMENTO DA DENSIDADE E CRESCIMENTO CELULAR DE MICROALGAS	59
4.5	REMOÇÃO DE NUTRIENTES E MATÉRIA ORGÂNICA RESIDUAL DO EFLUENTE UTILIZADO COMO MEIO DE CULTIVO	60
4.6	COLHEITA E SECAGEM DA BIOMASSA	61
4.7	EXTRAÇÃO DO ÓLEO INTRACELULAR	61
4.8	QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO TOTAL	62
4.8.1	Esterificação, identificação e quantificação dos estéres metílicos de ácidos graxos (fame’s)	62
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	63
4.10	ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS	64
4.10.1	Etapa 1: cultivo com a espécie <i>d. Subspicatus</i> e efluente pós-ds com e sem filtração.....	65
4.10.2	Etapa 2: cultivo com a espécie <i>d. Subspicatus</i> em efluentes pós-fas com e sem autoclavagem.....	67
4.10.3	Etapa 3: cultivo com as espécies <i>d. Subspicatus</i> , <i>s. Vulgaris</i> e <i>c.obliquus</i> e efluente pós-uasb.....	68
4.10.4	Etapa 4: cultivo com a espécie <i>d. Subspicatus</i> , <i>s. Obliquus</i> e <i>c. Vulgaris</i> com células suspensas e imobilizadas e efluentes pós-uasb e pós-fas.....	69
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	70
5.1	ETAPA 1 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA ESPÉCIE <i>D. SUBSPICATUS</i> EM EFLUENTE PÓS-DS COM E SEM FILTRAÇÃO	70

5.1.1	Crescimento da espécie <i>d. Subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em efluente pós-ds com e sem filtração	70
5.1.2	Avaliação da remoção de nutrientes e matéria orgânica residual do efluente após o cultivo de <i>d. Subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.....	80
5.1.3	Percentual de óleo do cultivo de <i>d. Subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluentes pós-ds com e sem filtração.	89
5.2	ETAPA 2 – AVALIAÇÃO DOS CRESCIMENTOS DE <i>DESMODESMUS SUBSPICATUS</i> EM EFLUENTE PÓS-FAS COM E SEM AUTOCLAVAGEM	92
5.2.1	Crescimento de <i>d. Subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-fas com e sem autoclavagem	92
5.2.2	Remoção de nutrientes e matéria orgânica do cultivo de <i>d. Subspicatus</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-fas com e sem autoclavagem	99
5.3	ETAPA 3- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA ESPÉCIE <i>D.SUBSPICATUS</i> , <i>S.OBLIQUUS</i> E <i>C.VULGARIS</i> EM EFLUENTE PÓS-UASB	108
5.3.1	Crescimento de <i>d.subspicatus</i> , <i>s.obliquus</i> e <i>c.vulgaris</i> com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, em metabolismos autotrófico e mixotrófico em efluente pós-uasb	108
5.3.2	Avaliação da remoção de nutrientes e matéria orgânica residual após cultivo de <i>d.subspicatus</i> , <i>s.obliquus</i> e <i>c.vulgaris</i> s com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-uasb	114
5.4	ETAPA- 4 REMOÇÃO DE NUTRIENTES, MATÉRIA ORGÂNICA E PRODUÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO AS ESPÉCIES <i>D. SUBSPICATUS</i> , <i>S. OBLIQUUS</i> E <i>C. VULGARIS</i> , SUSPENSAS E IMOBILIZADAS EM EFLUENTES PÓS-UASB E PÓS-FAS	123
5.4.1	Crescimento de <i>D.subspicatus</i> , <i>S.obliquus</i> e <i>C.vulgaris</i> , em efluentes pós- UASB e pós-FAS.....	123
5.4.2	Avaliação da remoção de matéria orgânica e nutrientes dos efluentes pós-UASB e pós-fas após o cultivo com células suspensas e imobilizadas.....	124
5.4.3	Percentual de óleo das espécies <i>D.subspicatus</i> , <i>S.obliquus</i> e <i>C.vulgaris</i> suspensas e imobilizadas em efluente pós-UASB e pós-FAS	129
5.4.4	Identificação e quantificação dos FAME´s.....	130
6	CONCLUSÕES.....	134

REFERÊNCIAS	139
ANEXO A – RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	146

1 INTRODUÇÃO

A utilização de microalgas em processos de tratamento de efluentes são uma das mais variadas formas de aplicação destes microrganismos que com base no metabolismo de crescimento, utilizam principalmente de luz, carbono, nitrogênio e fósforo na forma orgânica e inorgânica, sendo possível associar a produção de biomassa e subprodutos, à remoção de contaminantes presentes nos efluentes (PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011). As microalgas são organismos fotossintéticos oxigênicos que têm a capacidade de crescer rapidamente e sintetizar grandes quantidades de macromoléculas (carboidratos, proteínas, lipídios e etc.) e muitos produtos químicos (por exemplo, carotenóides, ficobilinas, ácidos graxos poliinsaturados e polissacarídeos solúveis em água) (UNNITHAN; UNC; SMITH, 2014).

Recentemente, pesquisas estão sendo desenvolvidas para produção de biocombustíveis a partir dos lipídios produzidos nas células das microalgas, que podem ser uma alternativa à atual exploração insustentável de outros recursos naturais para produzir combustíveis. Contudo, apesar da alta produtividade de biomassa de microalgas, os custos de produção ainda não são atrativos para a aplicação efetiva no mercado (DEMIRBAS, 2011). Sendo assim, as pesquisas estão se concentrando em tecnologias para diminuição destes custos e nesta perspectiva o uso de efluentes domésticos ou industriais no cultivo das microalgas podem oferecer uma abordagem de baixo custo e eficaz para remover o excesso de nutrientes e outros contaminantes, sendo utilizadas também como uma forma de tratamento terciário, além de evitar a eutrofização de corpos hídricos receptores (LUO; LE-CLECH; HENDERSON, 2017).

Existe uma diferença significativa entre óleo produzido por microalgas e o produzido por culturas oleaginosas, que é a produtividade lipídica (DEMIRBAS, 2011). As microalgas são capazes de produzir durante o ano todo, ou seja, não são dependentes das condições climáticas, não requer a utilização de herbicidas e pesticidas, podem ser produzidos coprodutos valiosos com a biomassa residual, bioetanol e metano através da fermentação da biomassa (HARUN; DANQUAH, 2011).

A otimização dos sistemas de cultivo de microalgas e maximização da produção de lipídios, além da determinação dos métodos mais eficientes para colheita, extração do óleo, são necessárias para tornar a produção do biocombustível a partir das microalgas mais sustentável (PERRINE; NEGI; SAYRE, 2012). Algumas destas condições de cultivo das

microalgas estão sendo manejadas pelos pesquisadores que já relataram que as microalgas podem produzir mais óleo em condições de estresse ou condições desfavoráveis, em comparação com as condições “ótimas” de crescimento (YEH; CHANG, 2012).

Existem vários tipos de sistemas de cultivos, onde as culturas suspensas ou imobilizadas de microalgas podem atuar. Têm-se os sistemas abertos, fechados e os híbridos (LARSDOTTER, 2006). O cultivo de sistema aberto compreende lagoas de alta taxa, lagoas de rolamento (raceway ponds paddle), tanques e lagoas circulares (SANTOS, 2017). O cultivo em sistema fechado pode ser realizado em fotobiorreatores tubulares, de painel plano ou do tipo carrossel (MENDOZA et al., 2013). E por fim o cultivo em sistema híbrido que une as vantagens, em duas fases, com utilização dos dois sistemas acima citados. Primeiramente é realizado o cultivo em um reator fechado e depois a biomassa é transportada para sistemas abertos (CAI et al., 2013).

Outro fator importante, que potencializa as vantagens da produção de lipídios através do cultivo de microalgas, está relacionado aos tipos de metabolismos (autotróficos, heterotróficos, mixotróficos e fotoheterotróficos) que algumas espécies possuem e a capacidade de modificarem o metabolismo como resposta às alterações no meio (CHEN et al., 2011). A compreensão e exploração destas formas de metabolismo permite aplicar às microalgas estratégias de cultivos visando o aumento da produção de biomassa algal, e seus coprodutos em grandes escalas.

Neste contexto, o presente estudo avaliou diferentes condições de cultivo das espécies de microalgas *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* em esgoto doméstico com o objetivo de proporcionar uma maior produção lipídica, e também, visando à remoção de nutrientes e matéria orgânica residual, para que os resultados possam subsidiar a aplicação em sistemas integrados de cultivo em larga escala para tratamento de efluentes e produção de biodiesel.

2 OBJETIVOS

Os experimentos foram realizados através do cultivo de espécies de microalgas em laboratório utilizando efluentes domésticos, com intuito de avaliar a viabilidade de produção lipídica e a remoção de matéria orgânica residual e nutrientes para que os resultados possam subsidiar a utilização em sistema de tratamento de efluentes em grande escala.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar diferentes condições de cultivo das espécies de microalgas *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* em efluentes domésticos para remoção de nutrientes, matéria orgânica residual e produção lipídica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a densidade celular e produção lipídica das microalgas utilizando os metabolismos autotróficos, heterotróficos e mixotróficos;
2. Avaliar comparativamente efluentes de diferentes etapas de uma estação de tratamento de esgoto como meio de cultivo de microalgas;
3. Investigar a influência do inóculo inicial de microalgas na densidade celular do cultivo e produção lipídica;
4. Estudar a interferência da presença microrganismos predadores no cultivo de microalgas;
5. Verificar a eficiência na remoção de matéria orgânica residual e nutrientes presentes no efluente utilizado como meio de cultivo das microalgas;
6. Avaliar o efeito da redução da concentração dos nutrientes ao longo do cultivo das microalgas como um fator para estimulação do acúmulo de lipídios nas células;
7. Avaliar efeito da imobilização das microalgas comparando com o cultivo em suspensão.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Cultivo massivo de microalgas tem sido alvo de interesse em diversos setores da bioindústria, no Brasil e no mundo. A capacidade desses organismos em produzir biomoléculas de relevante valor comercial, tais como pigmentos carotenoides, carboidratos, proteínas e principalmente lipídeos em forma de ácidos graxos poli-insaturados, tem sido a razão para tamanho interesse industrial, principalmente industriais do setor energético (KOMAKI 1998). Arelado a produção de biomoléculas, as microalgas podem também ser exploradas para remover nutrientes das águas residuárias, bem como a uma tecnologia biofixação dióxido de carbono, que pode reduzir a emissão carbono de todo o processo de tratamento (ARBIB et al., 2012).

3.1 CULTIVO DE MICROALGAS

Para realizar o cultivo de microalgas em grande escala é necessário primeiramente determinar o objetivo do cultivo, conhecer a espécie que melhor se adapta as condições ambientais, ter conhecimento aprofundado sobre metabolismo, demandas nutricionais, fisiologia e etc. (LUO; LE-CLECH; HENDERSON, 2017).

Sendo assim, têm sido desenvolvidos primeiramente cultivos experimentais em sistemas abertos ou reatores em pequena escala, para manejo de várias espécies e condições de cultivo, com o objetivo do desenvolvimento de tecnologias que possam resolver alguns problemas relacionados ao cultivo em larga escala para produção de diversos subprodutos (BRENNAN; OWENDE, 2010).

No cultivo experimental de microalgas acontece o isolamento da cepa e inoculação da espécie escolhida em meio aquoso contendo nutrientes. Em laboratório, utilizam-se meios de cultura com concentrações de macro e micronutrientes pré-estabelecidas e o cultivo geralmente é feito em ambiente fechado, com iluminação artificial e temperatura controlada. Tal procedimento permite não somente a produção de biomassa, mas também fornece informações básicas sobre as espécies cultivadas, úteis para o conhecimento de seu ciclo de vida, ecologia e fisiologia. As espécies podem ser também submetidas a estresses visando obter respostas fisiológicas das culturas, pela manipulação das condições de cultivo, como: iluminação, aeração, pH ou concentrações de nutrientes do meio de cultura (LOURENÇO, 2006).

Para a produção de biomassa de microalgas em sistemas de grande escala, há diversos tipos de sistemas de lagoas abertas, podendo variar desde lagoas circulares que apresentam equipamentos mecanizados para mistura da cultura; a lagoas simples, sem aparato mecânico para mistura. A *raceway paddle ponds*, também conhecidas como lagoas de rolamento, são compostas basicamente de canais independentes de circuito fechado de recirculação, com cerca de 20 a 30 cm de profundidade, onde o fluxo gerado pela turbina é guiado em torno de curvas e a mistura é promovida pela agitação de pás. São tanques de fácil manutenção, o qual permite a limpeza do biofilme acumulado na superfície (AZEREDO, 2012; FRANCO et al., 2013).

Apesar dos menores custos e facilidades operacionais da produção de microalgas em sistema abertos, a maior parte das pesquisas e experimentos estão sendo realizadas atualmente com o cultivo de microalgas em fotobiorreatores, que apresentam uma grande variedade de designs e configurações. Entre as mais utilizadas encontram-se: as tubulares, em colunas e em placas (ERIKSEN, 2008).

No cultivo de microalgas para produção de lipídios em sistemas fechados, o objetivo é aumentar a biomassa de algas e a concentração de lipídios. O crescimento de microalgas pode ser maximizado através do aumento da disponibilidade de nutrientes, e, portanto, através da promoção de condições análogas às condições eutróficas naturalmente encontradas e também submetendo as espécies a estresses ambientais para promover o acúmulo de óleo na célula (SCOTT; DAVEY; DENNIR, 2010).

3.2 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES PARA CULTIVO

As algas compreendem um grupo muito diverso de organismos que crescem em variados tipos de ambientes com diferentes parâmetros ambientais, como, por exemplo, concentração de nitrogênio e intensidade luminosa. Sendo assim, quando o objetivo é utilizar esses organismos como matéria-prima para a produção de lipídios e outros produtos com valor comercial, faz-se necessário realizar uma triagem e caracterização de espécies que possuam uma fisiologia adequada à produção de cada tipo de produto.

As espécies de microalgas que são utilizadas para produção de lipídios são geralmente as algas verdes aquáticas e unicelulares (Divisão Chlorophyta). Existem pesquisas mais recentes que também estão testando a Divisão Cyanophyta. As algas da Divisão Chlorophyta são caracterizadas por altas taxas de crescimento e elevadas densidades populacionais. Em boas condições, as algas verdes podem dobrar sua biomassa em menos de 24h. Além disso, as algas

verdes possuem elevados conteúdos lipídicos e esse elevado rendimento e densidade de biomassa é ideal para o cultivo intensivo (CHISTI, 2007).

3.2.1 Gênero *Scenedesmus*

O gênero *Scenedesmus* pertence à família Scenedesmaceae, Ordem Chlorococcales, Classe Chlorophyceae e divisão Chlorophyta (LEE, 2008). Possui clorofila a e b, xantofilas e os carotenóides α , β e γ . O produto fotossintético de armazenamento é o amido, que é composto de amilose e amilopectina e, ao contrário de outras algas, é formado dentro do cloroplasto (REYNOLDS, 2006). A morfologia pode variar consideravelmente pela alteração do meio de cultura onde estão crescendo (EGAN; TRAINOR, 1989). Em meio com pouco fósforo ou sais minerais, este gênero é induzido a crescer como única célula e quando privado de nitrogênio, podem ocasionalmente formar zoosporos (TRAINOR, 1992).

As espécies do gênero *Scenedesmus* vêm sendo apontadas nos últimos anos como as mais eficientes no processo de fixação de CO₂ acoplado ao tratamento de águas residuárias e à síntese de lipídios para a produção de biodiesel (CAI et al., 2013; TANG et al., 2011; XIN et al., 2010). Estudos de Xin, Hong-Ying e Yu-Ping (2011) selecionaram *Scenedesmus sp.* para a produção de óleo e apontaram seu elevado acúmulo nas células e capacidade de resistir a variações ambientais extremas e resistência às elevadas concentrações de nutrientes de águas residuárias.

O gênero é comumente encontrado em ambientes eutóficos ou em estudos de identificação de espécies de microalgas em lagoas de estabilização. Shanthala et al. (2009) identificou 71 espécies de algas em lagoas de estabilização no estado de Karnataka, na Índia, com um predomínio do gênero *Scenedesmus*. Paiva (2012) realizou a identificação de espécies de microalgas em uma lagoa de polimento do município de Rio Formoso, PE, e as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Scenedesmus acus* foram bastante abundantes.

3.2.2 Gênero *Desmodesmus*

Este gênero pertence a Ordem Sphaeropleales, Classe Chlorophyceae, Divisão Chlorophyta. As espécies do gênero *Desmodesmus* são livres flutuantes, formadas por duas, quatro, oito ou 16 células fusiformes, elipsoidais ou cilíndricas dispostas lado a lado em série linear. Cada célula é uninucleada e contém um cloroplasto parietal com um pirenoide. A

reprodução assexuada dá-se pela formação de autocolônias, as quais são liberadas pela ruptura da célula-mãe, a reprodução sexuada não é observada. (FRANCESCHINI et al., 2010).

Alguns estudos aprontaram que o gênero *Desmodesmus* poderia acumular até 21% de lipídios na sua célula, mas estudos recentes com espécies do mesmo gênero *Desmodesmus* têm conseguido maiores porcentagens de lipídios, com deficiência de nutrientes no meio de cultivo (PAN et al., 2011; SAMORÌ et al., 2013). Esta deficiência de nutrientes tem sido estudada em várias espécies de microalgas, aumentando a porcentagem de lipídios (AAKANKSHA et al., 2010) e com diferentes tipos de nutrientes, entre eles nitrogênio e fósforo (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA, 2010).

Existem poucos estudos que utilizam o gênero *Desmodesmus* em efluente domésticos para produção lipídica, isso se deve ao fato que, apenas recentemente *Desmodesmus* recebeu a classificação taxonômica de um gênero (VAN HANNEN et al., 2002).

3.2.3 Gênero *Chlorella*

O gênero *Chlorella* é composto por microalgas unicelulares pertencentes à Ordem *Chlorococcales*, Classe *Chlorophyceae* e família *Oocystaceae*. Apresenta forma de vida unicelular ou colonial. Possui forma esférica, sem flagelo e pode acumular pigmentos como clorofila a e b, β -caroteno e xantofilas. Através da fotossíntese se multiplica rapidamente requerendo só dióxido de carbono, água, luz solar, e pequenas quantidades de minerais para reproduzir-se (FRANCESCHINI et al., 2010).

As espécies encontram-se distribuídas por todo mundo, vivendo em diferentes habitats. São tanto encontradas em água doce (especialmente lagoas e reservatórios), como em águas salgadas. As espécies de *Chlorella* são facilmente cultivadas em laboratório e utilizadas em pesquisas de bioquímica, fisiologia vegetal e produção de óleo (FRANCESCHINI et al., 2010).

Uma das características do gênero *Chlorella* é a capacidade de se adaptar a condições de cultivo utilizando metabolismos autotrófico, heterotrófico ou mixotrófico. O gênero *Chlorella* contém diversas espécies que produzem diferentes quantidades de lipídios. Variando as condições de cultivo, pode render de 18,9 % (com limitação de N) a 22,2 % de lipídios (sob condições otimizadas) e ainda para estas mesmas condições de cultivo, foram obtidos 25,2 % e 38,0 %, respectivamente, para uma cepa mutante desta espécie (YEH; CHANG., 2012).

O gênero *Chlorella* é bastante abundante em sistema de lagoas de estabilização. Amengual-Morro et al. (2012), realizando um estudo sobre espécies bioindicadores em lagoas de estabilização apontou que o gênero é bastante comum nesses sistemas de tratamento, ou seja, tem capacidade de adaptação em condições ambientais de elevada concentração de matéria orgânica e nutrientes.

3.3 CULTIVO DE MICROALGAS COM UTILIZAÇÃO DE ÁGUAS RESIDUÁRIAS

Enquanto a demanda para a produção de biocombustíveis é, em parte impulsionada pelas preocupações ambientais, não há dúvida de que a construção e funcionamento de sistemas dedicados exclusivamente à produção de biomassa de algas com objetivo de geração de biocombustível têm impactos ambientais negativos, principalmente devido ao grande consumo de recursos hídricos. Clarens et al. (2010) concluiu que a produção de microalgas utilizando água doce e fertilizantes iria consumir mais energia, gerar maiores emissões de gases de efeito estufa e usar mais água do que a produção de biocombustíveis a partir de culturas oleaginosas.

Neste contexto e com base no metabolismo de crescimento das microalgas, que necessitam de carbono orgânico e formas inorgânicas (nitrogênio e fósforo) é possível associar a produção de biomassa com a remoção de contaminantes em águas residuárias (PITTMAN; DEAN; OSUNDEKO, 2011). Através da fotossíntese, as microalgas conseguem captar CO_2 da atmosfera ou do meio e converter em compostos orgânicos. Através dos processos de assimilação, as microalgas conseguem captar as formas inorgânicas de nitrogênio (NO_3^- , NO_2^- e NH_4^+) e produzir compostos orgânicos. Os fosfatos (PO_4^{3-}) presentes no meio são captados pelas microalgas e incorporados em compostos orgânicos como consequência da fosforilação, necessária para produção de ATP (CAI et al, 2013). Sendo as águas residuárias ricas em nitrogênio e fósforo, a sua aplicação como meio de cultura para microalgas é uma forma de reduzir os custos de produção e o impacto ambiental negativo do consumo de água.

Para o cultivo de microalgas são geralmente aplicadas águas residuárias domésticas, visto que não apresentam compostos tóxicos que inibam o crescimento de microalgas e que contêm uma razão N/P próxima da teórica ideal (RAWT et al., 2011).

Os mecanismos de remoção do nitrogênio e o fósforo das águas residuárias pelas microalgas ocorrem principalmente pela absorção nas células (ASLAN; KAPDAN, 2006; GARCIA et al., 2006). As espécies de microalgas mais estudadas para remoção de nitrogênio e de fósforo são *Scenedesmus* (SHI et al., 2007), *Chlorella* (HERNANDEZ et al., 2006) e

Spirulina (OLGUÍN et al., 2003). O uso de microalgas na remoção de nitrogênio e fósforo apresenta muitas vantagens, incluindo as seguintes (FERNÁNDEZ et al., 2008): (1) baixo custo devido a possibilidade de uso de energia solar nos sistemas de cultivo, (2) fixação simultânea de CO₂, (3) não exigem carbono orgânico em comparação aos processos biológicos de nitrificação - desnitrificação, (4) descarga de efluentes oxigenados em corpos d'água em decorrência dos processos fotossintéticos realizados pelas microalgas, (5) menor geração de lodo, e (6) alto potencial econômico da colheita da biomassa de algas para produção de fertilizantes, biogás, biocombustíveis, etc.

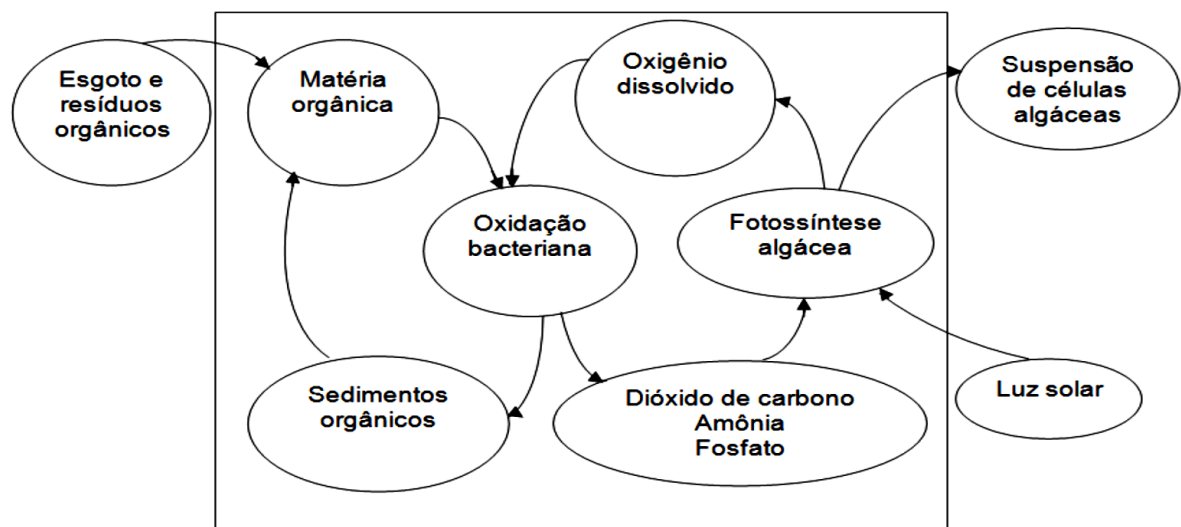
3.3.1 Interferência de organismos predadores no cultivo de microalgas com esgoto doméstico

A utilização de águas residuárias para produção de lipídios, geralmente possui grande concentração de bactérias que podem inibir o crescimento de microalgas competindo por nutrientes presentes nas águas residuárias, já que o crescimento bacteriano é mais rápido do que o crescimento de microalgas.

Os membros dos filos Proteobacteria, Bacteroidetes, Actinobacteria são geralmente encontrados nos esgotos e podem interagir direta ou indiretamente com as cepas de microalgas através de uma série de mecanismos que vão desde o comensalismo, mutualismo, parasitismo ou de antagonismo. Essas interações podem aumentar ou inibir a persistência de certos agentes patogênicos (UNNITHAN; UNC; SMITH, 2014).

As microalgas também podem facilitar o crescimento bacteriano através da troca direta de nutrientes, proporcionando compostos orgânicos liberados durante o crescimento ou pelo fornecimento de nutrientes a partir de células de microalgas em decomposição. A fotossíntese das microalgas fornece oxigênio para o meio, que é o aceptor de elétrons exigido pelas bactérias heterotróficas para mineralizar substâncias orgânicas presentes nas águas residuárias. Em contrapartida, as bactérias podem produzir substâncias que aumentam o crescimento de algas ou podem produzir ficotoxinas que inibem o crescimento. As microalgas também são capazes de produzir toxinas que são agentes antimicrobianos, que combinado com o pH elevado induzido pela fotossíntese têm se mostrado prejudicial para muitos microrganismos, incluindo coliformes fecais. A Figura 1 apresenta um esquema da relação entre microalgas e bactérias em um cultivo.

Figura 1 – Esquema da relação entre microalgas e bactérias em um cultivo



Fonte: Lourenço, 2006.

Alguns métodos já foram testados, para eliminação de bactérias do meio de cultivo, como por exemplo, a aplicação de radiação UV, como também a filtração por membrana (UNNITHAN; UNC; SMITH, 2014).

As microalgas também podem sofrer interferência da predação por uma enorme diversidade de taxas de protistas (por exemplo, ameba, flagelados e ciliados), bem como por zooplânctônicos e metazoários maiores (DAY et al., 2017).

Os efeitos da herbivoria por protistas em cultivos em grande escala podem ser observados a olho nu, pois ocorre uma mudança na cor em decorrência da redução da densidade de células de algas e em casos extremos o cultivo pode apresentar uma coloração marrom devido à "floração" dos organismos predadores e também devido a morte ou lise das células das algas (DAY et al., 2017).

Mudanças na coloração, densidade óptica ou turbidez poderiam formar a base de um sistema de monitoramento automatizado, porém é improvável que seja suficientemente sensível para detectar os estágios iniciais da infecção. Portanto, no momento em que os predadores forem detectados, pode ser tarde demais para aplicar quaisquer estratégias que possam estar disponíveis para controlar ou gerenciar a infecção. É, portanto, importante ter um sistema de monitoramento para detecção precoce da contaminação e para impedir que a herbivoria se torne um problema (DAY et al., 2017).

Em cultivos em fotobioreatores, para evitar a contaminação geralmente é utilizada a esterilização dos equipamentos e do meio de cultivo. No entanto, tais práticas são inviáveis em cultivos de grande escala, devido as implicações de custo, a menos que o produto seja de alto valor comercial. Em sistemas abertos de cultivo o desafio é ainda maior, na realidade, pouco pode ser feito para evitar a infecção. Existem apenas algumas técnicas que empregam barreiras físicas, por exemplo, (DAY et al., 2017).

3.3.2 Cultivo com células suspensas e imobilizadas

Cultivo em suspensão é a forma mais comumente usada para o crescimento de microalgas (PIRES et al., 2013). Embora os sistemas de cultivo de células suspensas sejam os mais utilizados, existem sérios problemas associados aos métodos de colheita aplicados para separação de microalgas do meio líquido e que consomem tempo, energia e encarecem a produção. Os sistemas de cultivo com utilização de microalgas imobilizadas surgem como uma alternativa aos sistemas de cultivo de células suspensas (HE; XUE, 2010).

A imobilização de uma célula pode ocorrer de forma natural ou por técnicas artificiais, impedindo a movimentação independentemente das microalgas. A imobilização natural ocorre pela habilidade das células de microalgas de se aderir a uma superfície específica, resultando na formação de biofilme. Na imobilização artificial de microalgas os métodos mais comumente aplicados incluem o aprisionamento das células dentro de uma matriz polimérica, normalmente

alginate e carragenina e adesão celular para formação de biofilme em uma superfície sólida (EROGLU; SMITH; RASTON, 2015).

Os estudos de imobilização de microalgas são geralmente voltados para o tratamento de águas residuárias, com base no princípio de manter as células vivas dentro de uma matriz de gel metabolicamente ativa o maior tempo possível. Após a absorção de contaminantes pelas microalgas imobilizadas, as águas residuárias tratadas podem ser facilmente separadas através da coleta dos polímeros, as microalgas podem ser reutilizadas e o processo pode ser repetido por vários ciclos.

O uso de matriz polimérica já demonstrou melhoria na produtividade de biomassa e de pigmentos e também do conteúdo lipídico (MALLICK, 2002; HAMEED; EBRAHIM., 2007). Contudo, os altos custos associados à matriz de imobilização podem ser um fator limitante quando o objetivo é processar grandes quantidades de águas residuárias.

No Quadro 21 estão demonstradas as principais vantagens e desvantagens de cultivo de microalgas utilizando células suspensas e imobilizadas.

Quadro 1- Vantagens e desvantagens dos sistemas de cultivo com algas suspensas e com algas imobilizadas

Sistema de cultivo	Vantagens	Desvantagens
Sistema de cultivo com algas suspensas	– Amplamente estudado e otimizado; – Quantidades maiores de águas residuárias podem ser processadas; – Aplicável em grande escala.	– Colheita de microalgas após o tratamento de águas residuárias é complexo e de alto custo.
Sistema de cultivo com algas imobilizadas	– Colheita de microalgas após o tratamento de águas residuárias é mais simples; – Matriz de imobilização confere maior resistência das células para ambientes hostis, como salinidade, toxicidade, metais e mudanças de pH.	– Custos elevados associados ao matriz polimérica (no caso de aprisionamento de células); – Alta área superficial requerida (no caso de adesão microalgal e formação de biofilme); – Limitação de luz pode ocorrer; – Aplicável apenas para pequenas escalas e operações em escala piloto.

Fonte: Gonçalves, Pires e Simões, 2017.

3.3.3 Fatores influentes no cultivo de algas

Diversos estudos em escala experimental já foram realizados para avaliar a produção de biomassa, lipídios e a composição do ácido graxo produzido, utilizando diversas espécies de microalgas e modificando fatores ambientais como, temperatura, pH, luminosidade, meios de cultivos, estresses, entre outros (MIAO; WU, 2004).

3.3.3.1 Nutrientes (N e P)

Geralmente, as microalgas podem assimilar nitrato, amônia e outras fontes orgânicas de nitrogênio, como uréia. Algumas cianobactérias são capazes fixar o nitrogênio atmosférico (BECKER, 1994).

O nitrogênio é um fator crítico para a regulação do conteúdo lipídico celular das algas (BRENNAN; OWENDE, 2010) e pode ser manipulado para proporcionar um maior acúmulo de lipídios pelas células. Enquanto as células de microalgas têm tipicamente um teor de aproximadamente 20% (CHISTI, 2008), acumulação de níveis de lipídios maiores que 40%, ocorre quando o nitrogênio se torna um fator limitante do crescimento. No entanto, usando limitação de nitrogênio para estimular o acúmulo de lipídios em células de algas, muitas vezes reduz o crescimento da biomassa de algas.

O fósforo é outro nutriente importante para o cultivo de microalgas e é um fator limitante ao crescimento. Este elemento é essencial para a maioria dos processos celulares, como biossíntese de ácidos nucleicos, transferência de energia e formação de fosfolipídios, componentes da membrana celular. As microalgas podem assimilar o fosfato inorgânico (H_2PO_4^- ou HPO_4^{2-}); fósforo orgânico, sendo necessária sua hidrólise por fosfatases extracelulares próprias ou bacterianas (BECKER, 1994).

3.3.3.2 Temperatura

A produtividade de algas aumenta com a elevação da temperatura, até uma temperatura ideal, quando o cultivo é realizado em sistemas abertos. Contudo, valores acima do ideal podem gerar o aumento da respiração de algas e fotorrespiração e reduzir a produtividade geral (PULZ, 2001). A temperatura ótima medida em condições de taxa máxima de crescimento de algas

(nutrientes suficientes e condições de luz) varia dentre as espécies de algas, mas geralmente está entre 25 e 35° C (GROBBELAAR; SOEDER et al., 1985).

O efeito da temperatura sob a composição dos lipídios das membranas tem sido avaliado. Já se tem o conhecimento que as temperaturas abaixo do nível ótimo de crescimento, influenciam no grau de insaturações dos ácidos graxos, ocorrendo um aumento da estabilidade e fluidez das membranas celulares, em especial as membranas dos tilacóides, protegendo assim o aparato fotossintético da fotoinibição em baixas temperaturas. Em contrapartida, altas temperaturas proporcionam a produção de carotenóides. O aumento na temperatura também influencia o consumo de nitrogênio e carbono, bem como o tamanho celular. Desta forma, exige-se uma maior concentração desses nutrientes para suprir a necessidade das células na mesma velocidade de crescimento (HU, 2004).

3.3.3.3 pH

Valores de pH favoráveis para a maioria dos cultivos estão na faixa entre 7 e 9 (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Em meios de cultivos com alta densidade celular, o metabolismo fotossintético e a ausência de um sistema de controle do pH pode resultar limitação do crescimento e alteração do equilíbrio de CO_2 , HCO_3^- e CO_3^{2-} dissolvidos em água (BARSANTI; GUALTIERI, 2006). Em contrapartida, O pH acidificado pode ser tóxico para as microalgas (PANDEY et al., 2013).

Em sistemas abertos de cultivo o pH do meio afeta muitos dos processos bioquímicas associado com o crescimento e metabolismo de algas. A fotossíntese das algas gera a elevação do pH (frequentemente pH superior a 11) pelo consumo de CO_2 e H_2CO_3 , (PARK; CRAGGS, 2010). O pH elevado pode agir para melhorar a remoção de nitrogênio amoniacal através volatilização de amônia e do fósforo por meio de precipitação, quando são utilizadas águas residuárias no cultivo (CRAGGS, 2005). Esses processos são importantes para remoção de nutrientes em água residuárias, porém o pH muito elevado pode comprometer o crescimento algal.

3.3.3.4 Gás carbônico

As microalgas fotossintéticas nos cultivos fotoautotróficos precisam de uma fonte de carbono inorgânico, que pode adicionada na forma de sais de carbonato ou bicarbonato dissolvidos no meio ou, mais comumente, na forma de CO₂ de uma fase gasosa em contato com o meio líquido (CUELLAR-BERMUDEZ et al., 2016).

A agitação pode melhorar a transferência do CO₂ do ar atmosférico para o cultivo (ANDERSEN, 2005). Porém, a concentração de CO₂ no ar é muito baixa frequentemente não é suficiente para suprir as necessidades das microalgas, podendo ocorrer à limitação do crescimento. Portanto, para alcançar uma alta produtividade de biomassa, é comum suplementar CO₂ ao meio através do fornecimento de ar enriquecido com CO₂ (MORAIS; COSTA, 2008).

A disponibilidade de CO₂ em lagoas abertas de tratamento de águas residuárias é predominantemente dependente da oxidação de compostos orgânicos por bactérias heterotróficas (CRAGGS, 2005b). A utilização de esgoto doméstico para o cultivo de microalgas pode diminuir a necessidade de introdução de CO₂, já que esse é produzido normalmente através atividade bacteriana, presentes no efluente. Portanto, como uma solução a curto prazo, o cultivo de microalgas para biocombustíveis pode utilizar esgoto doméstico para reduzir o custo (BHATNAGAR et al., 2009).

3.3.3.5 Oxigênio Dissolvido

O oxigênio dissolvido é um fator influente, principalmente em sistema de cultivo abertos onde pode ocorrer o aumento da concentração durante o dia a níveis de oxigênio dissolvido acima 200% de saturação (PARK; CRAGGS, 2010), devido à atividade fotossintética. Entretanto, altas concentrações de oxigênio dissolvido podem interferir no crescimento algas. Estudos realizados por Molina et al., (2001) demonstraram que houve uma diminuição na biomassa algal de 17-25%, quando saturação de oxigênio dissolvido atingiu 200-300%, respectivamente.

3.3.3.6 Iluminação

A disponibilidade e intensidade de luz afetam o crescimento, especialmente nos cultivos fotoautotróficos, em decorrência da taxa fotossintética e pelo aumento crescimento celular com o aumento da intensidade luminosa até que seja atingido o ponto de saturação. A partir desse ponto, o aumento da intensidade luminosa pode causar fotoinibição, que provoca danos aos receptores de luz das células, causando a diminuição das velocidades de fotossíntese e de crescimento (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

Nos cultivos em lagoas abertas ou em fotobioreatores pode ocorrer o sombreamento devido à alta densidade de células. Para diminuir o sombreamento das células pode-se diminuir a espessura da camada líquida dos cultivos, permitindo uma maior penetração da luz, em sistemas abertos (lagoas). A agitação constante também contribui para a minimização desses dois problemas, pois as células ficam constantemente transitando pelas regiões mais e menos iluminadas (ALABI; TAMPIER; BIBEAU, 2009).

3.3.4 Metabolismo das microalgas

Para aumentar a produção de biomassa algal e seus coprodutos em grandes escalas é fundamental a otimização do cultivo a partir da compreensão do metabolismo que se pode aplicar a cada espécie de microalga. Tradicionalmente, o cultivo de microalgas explora seu metabolismo autotrófico, no entanto, estudos têm apontado vantagens da produção de biomassa por outras vias metabólicas (BUMBAK et al., 2011). No Quadro 2 estão demonstradas as principais vantagens e desvantagens dos metabolismos.

Quadro 2- Vantagens e desvantagens dos metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico para produção lipídica.

Tipo de Metabolismo	Vantagens	Desvantagens
Autotrófico	Apresentam densidades celulares elevadas; – Utilizam a luz como única fonte de energia que é convertido em energia química através de reações fotossintéticas, sem necessidade de fontes externas de carbono;	– Geralmente apresentam quantidades relativamente baixas de lipídios por célula; – Necessidade de introdução de luz artificial; – Pode ocorrer fotoinibição;

		– Maiores custos de colheita quando comparado ao cultivo heterotrófico.
Heterotrófico	– Maior facilidade de aumento de escala; – Possibilidade de cultivo em grandes densidades; – Maior facilidade de controle de parâmetros e menor interferência dos fatores climáticos no processo de produção; – Alta produtividade e melhor taxa de crescimento (dependendo da espécie utilizada);	– Custo com fonte de carbono externa; – Não fixa dióxido de carbono e, portanto, não pode ser utilizada para mitigar a emissão deste gás; – Aumento dos custos com esterilização; – Menor número de cepas de microalgas que podem ser utilizadas em cultivos heterotróficos em grande escala;
Mixotrófico	– Não ocorre fotoinibição; – Diminuição da fotoxidação; – Alta taxa metabólica; – Fixação de gás carbônico; – Necessita de menor intensidade luminosa do que o fotoautotrófico.	– Dificuldade operacional; – Inibição pela fonte de carbono; – Custos com fonte orgânica de carbono; – Maior dificuldade de aumento de escala.

Fonte: Angelo, Andrade e Colozzi Filho, 2014.

Contudo, para produção de condições para o crescimento celular das microalgas em diferentes metabolismos, muitas vezes se faz necessária a utilização de meios de cultura sintéticos, introdução de nutrientes e iluminação artificial que podem encarecer o processo produtivo, tornando a produção de biodiesel a partir de óleos de microalgas insustentável economicamente. Entretanto, alguns desses problemas relacionados aos custos com o cultivo veem sendo contornados a partir do uso de águas residuárias como fonte de carbono e nutrientes, por exemplo, (LUO; LE-CLECH; HENDERSON, 2017).

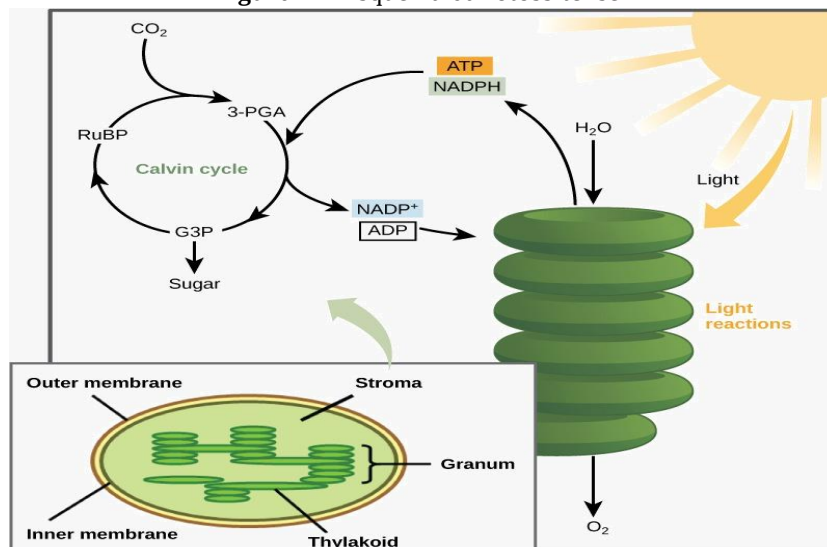
Para o desenvolvimento dos sistemas de cultivo é interessante explorar a diversidade metabólica das microalgas. A escolha do melhor sistema a ser utilizado dependerá do objetivo do cultivo, devido às vantagens e desvantagens de cada um, bem como das características das microalgas utilizadas (ANGELO; ANDRADE; COLOZZI FILHO, 2014).

3.3.4.1 Metabolismo Autotrófico

No crescimento autotrófico a luz é utilizada como uma fonte de energia única que é convertida em energia química por meio de reações de fotossíntese. No cultivo de espécies com metabolismo autotrófico, podem ser utilizadas fontes de iluminação artificial, pois, mais de 25% da biomassa produzida durante o dia, pode ser perdida durante a noite por causa da respiração (CHISTI, 2007).

A fotossíntese é dividida em duas fases: a fase clara e a fase escura. Na fase clara, ocorre a interação dos fótons da luz com os pigmentos fotossintéticos presentes no fotossistema II, ocasionando a oxidação da clorofila, que doa elétrons para compostos presentes em uma cadeia de transporte de elétrons presente na membrana tilacóide. O fluxo de elétrons gera um fluxo de prótons que é utilizado para a síntese de ATP pela enzima ATPsintase. Os elétrons são transferidos por citocromos para o fotossistema I, também responsável pela absorção de energia luminosa. Estes elétrons são utilizados na geração de potencial redutor na forma de NADPH (MAGRO et al., 2016). Na fase de escura, o dióxido de carbono é reduzido para carboidratos no ciclo de Calvin, utilizando a energia derivada do NADPH e ATP. O CO_2 condensa-se com a ribulose-1,5-bisfosfato (RuBP), formando um composto instável, com seis carbonos, que é rapidamente hidrolisado a duas moléculas de 3-fosfoglicerato pela enzima ribulose 1,5-bisfosfato carboxilase/oxigenase. Uma das moléculas de 3-fosfoglicerato é utilizada como substrato para a formação de carboidratos, enquanto a outra é usada na regeneração da ribulose-1,5 bisfosfato (MARKOU; ANGELIDAKI; GEORGAKAKIS, 2012). Na Figura 2 apresenta o esquema da fotossíntese.

Figura 2 - Esquema da fotossíntese



Fonte: Magro et al., 2016.

3.3.4.2 Metabolismo Heterotrófico

As microalgas que possuem metabolismo heterotrófico apresentam algumas características como: a necessidade de uma fonte orgânica externa para obtenção de energia e carbono, não realizam fotossíntese e desta forma não necessitam de luz para sobreviver (BUMBAK et al., 2011).

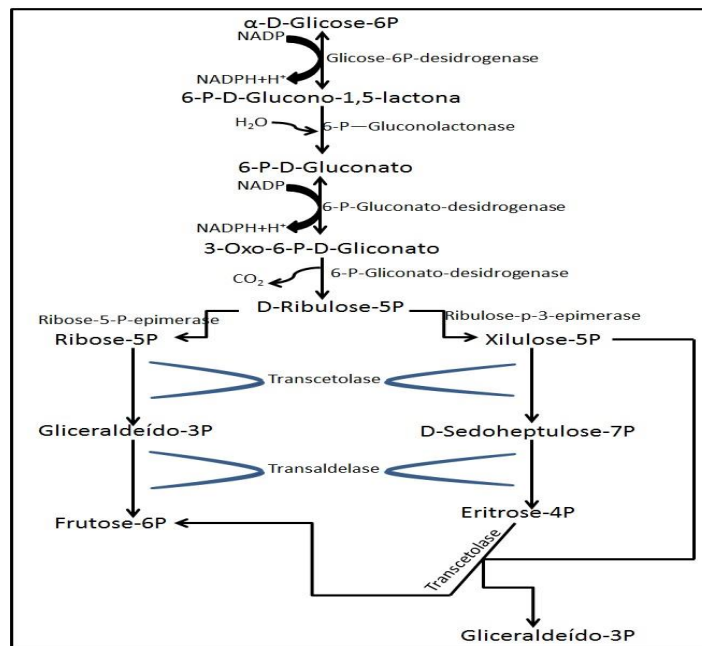
Os sistemas heterotróficos fornecem um alto grau de controle de crescimento e também menores custos de colheita devido às maiores densidades celulares alcançadas. No cultivo heterotrófico, a fonte de carbono mais utilizada são os açúcares, especialmente a glicose (MIAO; WU, 2006), porém, outras fontes orgânicas de carbono podem ser utilizadas, tais como glicerol (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; O'GRADY; MORGAN, 2011) e acetato (LIANG; SARKANY; CUI, 2009; HEREDIA-ARROYO; WEI; HU, 2010). Além disso, diversos estudos apresentam fontes alternativas de meio de cultivo, como os resíduos agroindustriais e efluentes sanitários (XIN et al., 2010).

Segundo Azma et al. (2011), várias espécies de microalgas possuem a capacidade de crescer heterotroficamente: *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella protothecoide*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Chlorella regularis*, *Chlorella vulgaris*, *Euglena gracilis*, *Scenedesmus actus*, *Scenedesmus obliquus*, *Nitzschia alba*, *Nannochloropsis oculata*, *Haematococcus pluvialis*, entre outras. Essas espécies têm em comum as seguintes características: (1) permeabilidade celular à fonte de carbono orgânica, (2) transporte ativo da fonte de carbono orgânico e (3) fatores enzimáticos presentes no interior da célula. O fator determinante para o metabolismo heterotrófico é a entrada da fonte de carbono orgânico na célula.

A introdução de fonte de carbono no cultivo é um dos itens que mais encarecem os cultivos heterotróficos (LI; XU; WU, 2007). Diante deste contexto, estudos têm sido desenvolvidos para o uso de águas residuárias como meio de cultivo heterotrófico de microalgas (BEEVI; SUKUMARAN, 2014). Contudo, o foco principal destes estudos tem sido o tratamento do efluente, e não a produção de biomassa e biodiesel, sendo estes, apenas subprodutos do processo (GONÇALVES; PIRES; SIMÕES, 2017).

De acordo com Perez-Garcia et al. (2011), a via metabólica das pentoses, é rota inicial de consumo da glicose em metabolismos heterotróficos. Na Figura 3 está demonstrada a Via das Pentoses.

Figura 3 - Via das pentoses

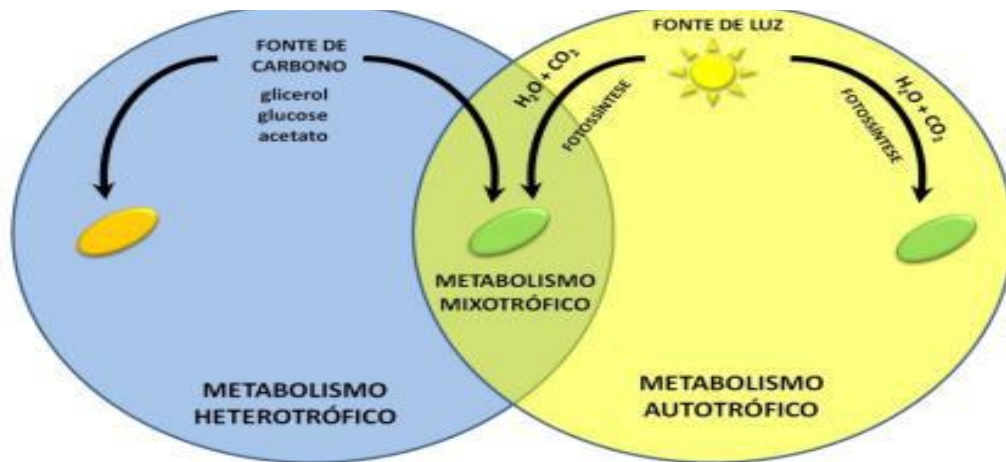


Fonte: Lehninger, Nelson e Cox, 1995.

3.3.4.3 Metabolismo Mixotrófico

As microalgas com metabolismo mixotrófico produzem oxigênio na fotossíntese que é consumido na rota heterotrófica. Ao mesmo tempo, o gás carbônico gerado da oxidação do composto orgânico é aproveitado na fotossíntese, pela mesma microalga. Contudo, não há equilíbrio entre as taxas de respiração e de fotossíntese. Em um sistema ideal haveria uma correspondência entre consumo e produção destes gases e não ocorreria liberação de gás carbônico ou oxigênio para o meio externo. Porém, na prática, ocorre a liberação dos gases, dependendo de qual rota metabólica predominante durante o cultivo (WANG; YANG; WANG, 2014). A Figura 4 apresenta o esquema do metabolismo mixotrófico.

Figura 4 - Esquema do metabolismo mixotrófico



Fonte: Mariano et al., 2010.

Existem alguns estudos que exploraram o potencial de cepas mixotróficas. Córdoba et al. (2008) fizeram estudos utilizando *Chlorella zofingiensis*; Mezzomo et al. (2010) utilizaram a *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*); Girard et al. (2014) estudaram o cultivo de *Scenedesmus obliquus*, Bonini e Bastos (2012) desenvolveram pesquisas com *Chlorella vulgaris*.

De acordo com Markou e Georgakakis (2011), um fato importante do cultivo mixotrófico é a possibilidade de economia de energia elétrica, caso seja utilizada a iluminação artificial, devido às cepas de microalgas mixotróficas requerem menor intensidade luminosa para o seu crescimento (GARCIA et al., 2005).

3.4 BIOSSÍNTESE DE LIPÍDIOS NAS MICROALGAS

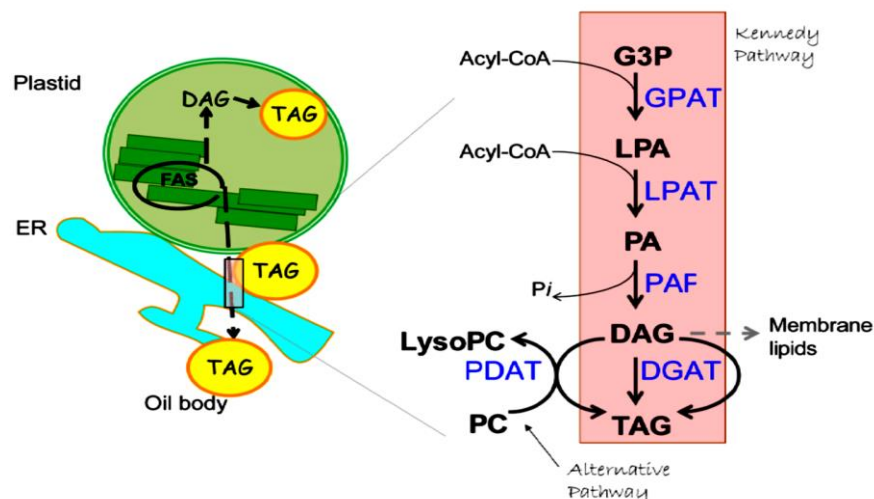
Os lipídios são um conjunto de substâncias químicas que, ao contrário das outras classes de compostos orgânicos, não são caracterizadas por algum grupo funcional comum, e sim pela sua alta solubilidade em solventes orgânicos e baixa solubilidade em água (NELSON; COX, 2011).

Os lipídios presentes na biomassa de microalgas são divididos em duas classes principais, com base em suas características químicas: polares (fosfolipídios- fosfatidilinositol, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e glicolipídios) e neutros (tri-, di- e mono- glicerídeos, ceras e isoprenóides). Uma subcategoria importante de lipídios polares são os glicolipídios (GREENWELL et al., 2010).

Os ácidos graxos são unidades fundamentais da maioria dos lipídios. São ácidos orgânicos de cadeia longa; possuindo um grupo carboxila único e uma “cauda” hidrocarbonada não-polar, que confere à maioria dos lipídios a sua natureza oleosa e gordurosa, insolúvel em água (NELSON; COX, 2011). Os ácidos graxos podem ser tanto saturados quanto insaturados. No geral, os ácidos graxos saturados e monoinsaturados são os mais predominantes nas microalgas (BOROWITZKA, 1988). Mas também, ocorre a produção de ácidos graxos poliinsaturados.

Na maioria dos organismos, a síntese dos ácidos graxos ocorre na região citoplasmática, porém, nos vegetais fotossintéticos e microalgas, ocorre no estroma do cloroplasto. Essa diferença no local de síntese de ácidos graxos ocorre devido à produção de NADPH nos cloroplastos pelas reações de luz da fotossíntese (NELSON; COX, 2011). As rotas de formação de ácidos graxos e triglicerídeos em microalgas podem ser divididas nas seguintes etapas: formação da acetil coenzima A (acetil-coA) no citoplasma; o alongamento e insaturação da cadeia de carbono de ácidos graxos, dependente principalmente dos sistemas enzimáticos acetil-coA carboxilase (ACCE) e ácido graxo sintase (FAS); e a biossíntese de triglicerídeos, tendo L- α -fosfoglicerol e acetil-coA como os dois maiores iniciadores (primers) (HU et al., 2008; HUANG; CHEN; WEI, 2010). A Figura 5 apresenta um esquema da biossíntese de lipídios na célula das microalgas.

Figura 5 - Biossíntese de lipídios nas células das microalgas



Fonte: BEISSON et al., 2013

*CoA, coenzima A; DAG, diacilglicerol; DGAT, diacilglicerol aciltransferase; ER, retículo endoplasmático; GPAT, glicerol-3-fosfato aciltransferase; FAS, síntese de ácidos graxos; G3P, glicerol 3-fosfato; LPAT, ácido aciltransferase lisofosfatídico; LPA, ácido lisofosfatídico; MAG, mono-monoglicerol; PA, ácido fosfatídico; PAF, fosfatase do ácido fosfatídico; PL, fosfolípido; PDAT, fosfolípido: diacilglicerol aciltransferase.

A formação de cada composto no interior da célula de microalga é regulada por complexos mecanismos metabólicos. Em microalgas verdes, por exemplo, o complexo sistema coletor de luz ligado à clorofila e ao carotenóide captura energia solar na forma de fótons. Esta energia é utilizada pelo fotossistema II na oxidação catalítica da água, liberando prótons, elétrons e molécula de O₂. Os elétrons com baixo potencial são transferidos através da cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos que levam à redução da ferredoxina para a formação de NADPH. Um gradiente eletroquímico é formado devido à liberação de prótons após a oxidação da água para o lúmen do tilacóide, o qual é utilizado para conduzir a produção de ATP via ATP sintase. Os produtos fotossintéticos NADPH e ATP são os substratos para o ciclo de Calvin-Benson, onde o CO₂ é fixado em moléculas de três átomos de carbono que são assimilados em açúcares, amido, lipídios, ou outras moléculas exigidas para o crescimento celular. Já o substrato para a hidrogenase, H⁺ e e⁻, são supridos tanto via cadeia de transporte de elétrons fotossintéticos como via fermentação do carboidrato(amido) armazenado (BEER et al., 2009).

As características dos ácidos graxos que compõem os lipídios devem ser levadas em consideração, pois as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção, são dependentes dessa composição (HU et al., 2008; HUANG; CHEN; WEI, 2010). Dessa maneira, os cinco ácidos graxos geralmente encontrados em óleos vegetais são o palmítico (hexadecanóico)-, esteárico (octodecanóico), oléico (Z-octadecenóico), linoléico (Z – octadecadienóico) e linolênico(octadecatrienóico).

No geral, a biossíntese de lipídios por microalgas produz ácidos graxos de 16 e/ou 18 átomos de carbono. Estes são usados como os precursores para a síntese de membranas celulares, bem como para a síntese de lipídios de armazenamento, principalmente triacilglicerol, que podem ser acumulados sob condições ambientais adversas (HU et al., 2008). Segue abaixo, no **Erro! Autoreferência de indicador não válida.3**, os principais ácidos graxos produzidos por algumas espécies de microalga.

Quadro 3 - Principais ácidos graxos produzidos por espécies de microalgas.

Microalgas	Principais ácidos graxos
<i>Dunaliella salina</i>	C14:0/C14:1/C16:0/C16:3/C16:4/C18:2/C18:3
<i>Isocrysis sp.</i>	C:14/C14:1/C16:0/C16:1/C18:1/C18:3/C18:4/C22:6
<i>Nannochlons sp.</i>	C14:0/C14:1/C16:0 / C16:1/C16:1/C20:6
<i>Chorella sp.</i>	C14:0/C16:0/C18:0/C16:1/C18:1/C22:1/C16:2/C16:3/C16:4/C18:2/C18:3
<i>Scenedesmus sp</i>	C14:0/C16:0/C18:0/C20:0/C22:0/C24:0/C16:1/C18:1/C20:1/C16:2/C16:3/C16:4/C18:2/C18:3/C18:4/C22:2
<i>Desmodesmus sp.</i>	C14:0/C16:0/C18:0/C20:0/C22:0/C16:1/C18:1/C16:2/C16:3/C16:4/C18:2/C18:3/C18:4/C20:2

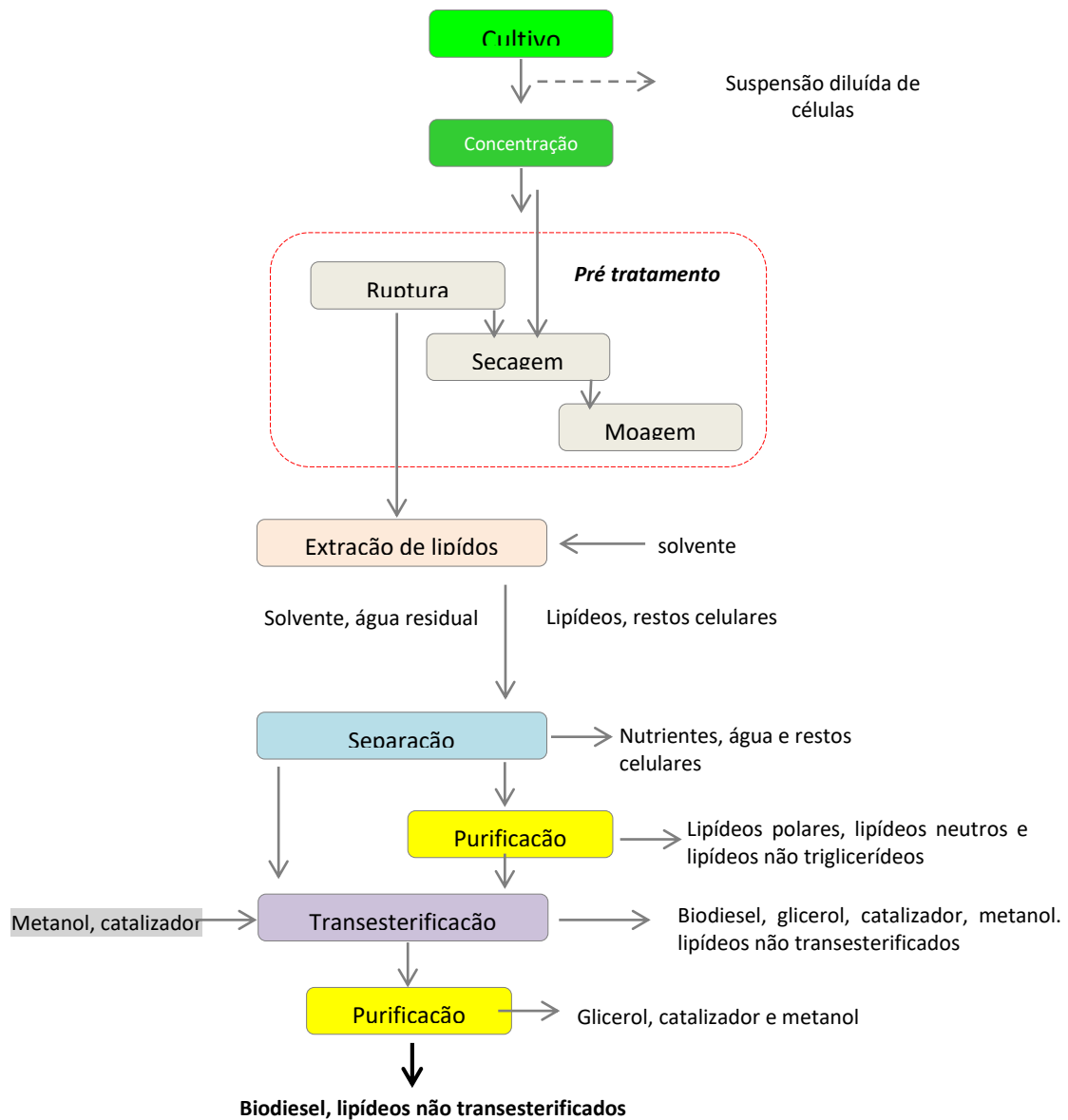
Fonte: Azeredo, 2012.

Existem alguns fatores que influenciam a biossíntese de lipídios, tais como: nutrientes disponíveis, a salinidade e o pH, além de fatores físicos como a intensidade luminosa e a temperatura. As condições que comumente proporcionam o aumento da produção de lipídios são desfavoráveis as que promovem a alta produtividade de biomassa, dessa forma é importante que haja um equilíbrio entre crescimento de biomassa e produção de lipídios (AZEREDO, 2012). Os fatores que influenciam o crescimento de biomassa ou a produção de lipídios podem ser manipulados para se atingir os objetivos do cultivo.

3.5 ETAPAS PARA PRODUÇÃO LIPÍDICA A PARTIR DE MICROALGAS

A produção comercial de metabólitos intracelulares de microalgas requer o seguinte: (1) produção em larga escala de biomassa de microalgas; (2) recuperação da biomassa através da separação sólido-líquido; (3) secagem da biomassa; (4) extração dos metabólitos da biomassa; e (4) purificação do extrato bruto. A Figura 6 apresenta um esquema para demonstração das etapas de produção de biodiesel a partir de microalgas.

Figura 6 - Etapas da produção de biodiesel a partir de microalgas.



Fonte: Mata, Martins e Caetano, 2010.

3.5.1 Métodos de colheita e secagem das microalgas

A colheita de biomassa requer um ou mais passos de separação entre sólido-líquido. Os custos da colheita da biomassa são considerados um dos principais pontos limitantes da produção de biodiesel através do cultivo de microalgas e que contribui com 20% a 30% do total custo de produção. A recuperação da biomassa pode ser um problema significativo devido ao pequeno tamanho das células de algas, como também pelo ambiente de crescimento, geralmente bastante diluído (MOLINA-GRIMA et al., 2003).

Os métodos de colheita comumente utilizados incluem a sedimentação, centrifugação, filtração, ultra-filtração, às vezes com uma etapa adicional de floculação, eletrofloculação ou uma combinação de flotação com floculação (PRAGYA; PANDEY; SAHOO., 2013).

O processo de filtração pode ser insatisfatório para grandes volumes, devido a lentidão do procedimento. A sedimentação por gravidade, possivelmente reforçada pela floculação, pode ser o método interessante. A utilização de tanques de sedimentação são geralmente para recuperação de biomassa a partir de sistemas que utilizam águas residuárias no cultivo (MOLINA-GRIMA et al., 2003).

A recuperação da biomassa com uso de centrífugas pode ser viável para produtos de alto valor. As centrífugas podem processar grandes volumes e de forma relativamente rápida e a biomassa pode permanecer totalmente preservada durante a recuperação (MOLINA-GRIMA et al., 2003).

Na floculação vários métodos podem ser usados para agregar as células de microalgas e aumentar o tamanho efetivo da "partícula", facilitando os processos posteriores a recuperação que podem ser através da sedimentação, centrifugação ou filtração. O uso de flocculantes tem o objetivo de neutralizar ou reduzir a carga de superfície através da adição de cátions e polímeros catiônicos. Os sais metálicos multivalentes são flocculantes ou coagulantes eficazes. Os sais comumente usados incluem cloreto férrico (FeCl_3), sulfato de alumínio ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$) e sulfato férrico ($\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$) (GUTIÉRREZ et al., 2015).

Após a colheita, é necessário a secagem da biomassa para promover de forma mais eficiente a ruptura das células para extração do lipídeo. Em alguns casos, a extração com solvente utilizando a biomassa seca tem demonstrado uma maior recuperação de metabólitos intracelulares do que a biomassa úmida. Produtos intracelulares como óleos podem ser de difícil extração a partir de biomassas úmidas de células não rompidas, mas são extraídas facilmente se a biomassa for seca anteriormente (BARROS et al., 2015).

Vários métodos têm sido aplicados para a secagem de microalgas como *Chlorella*, *Scenedesmus* e *Spirulina*, sendo que dentre os mais comuns têm-se a secagem com spray (spray-drying) com a pulverização da amostra em uma câmara submetida a uma corrente de ar quente; tambor de secagem (drum-drying) que é a transferência de calor para a amostra através das paredes internas do cilindro do tambor; liofilização para o congelamento da amostra e remoção da umidade por sublimação, estufa e a secagem ao sol. A secagem ao sol é mais utilizada para biomassa com um baixo teor de umidade e a secagem com spray não é economicamente viável

para produtos de baixo valor, como biocombustíveis e proteínas. A liofilização tem sido utilizada para secagem de microalgas em pesquisas laboratoriais. No entanto, este método é muito caro para ser utilizado em uma escala comercial para a recuperação de produtos das microalgas (GRIMA et al., 2003; BRENNAN; OWENDE, 2010; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

3.5.2 Métodos de extração de óleo

Vários métodos para romper a parede celular podem ser utilizados, os quais podem ou não utilizar a ação mecânica como a utilização de prensas, por exemplo. O congelamento, o uso de solvente orgânico, choque osmótico e reações ácidas, básicas e enzimáticas são exemplos de ações não mecânicas.

O ultrassom pode ser utilizado para romper células de microalgas suspensas em pequenas quantidades de biomassa, mas este não é aplicável em grandes escalas. O tratamento com álcalis é outro método efetivo de ruptura da parede celular, mas geralmente não é adequado para produtos sensíveis como proteínas. No entanto, a ruptura alcalina pode ser utilizada para isolar ácidos graxos livres. Todavia, os métodos mais utilizados para a extração de lipídios das microalgas são através das prensas mecânicas e solventes apolares, assim como é realizado com oleaginosas tradicionais (GRIMA et al., 2003; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Os principais solventes utilizados são benzeno, éter, hexano, clorofórmio, metanol ou a mistura dos dois, que são usados para promover a extração de lipídios. O uso de enzimas é outro método de extração eficaz, que torna o fracionamento do óleo mais fácil. Além destes métodos, o tradicional choque osmótico também é usado para rompimento da célula de microalgas. Embora seja um método barato e economicamente viável, nem todas as microalgas são rompidas eficientemente por choque osmótico. Um método bastante inovador é a extração com fluido supercrítico, onde o gás CO₂ sofre pressão e aquecimento, adquirindo ambas as propriedades de líquido e gás. Este fluido liquefeito atua como solvente, extraindo o óleo da matéria-prima. Neste processo é possível capturar mais energia a partir da célula lipídica, favorecendo a conversão, sendo substancialmente melhor quando comparado ao processo convencional (GRIMA et al., 2003; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

Variações de processos de extração de lipídios derivados de microalgas produtoras de óleo, como a *Chlorella vulgaris*, ainda estão sendo pesquisadas, a fim de se explorar a biodisponibilidade celular de lipídios. A moagem e trituração têm sido uma alternativa,

acompanhadas de ultrassom, ação enzimática ou, ainda, micro-ondas, que são ferramentas potenciais, que podem aperfeiçoar metodologias para o aproveitamento da matéria-prima para posterior obtenção de biodiesel (GRIMA et al., 2003; MATA; MARTINS; CAETANO, 2010).

4 METODOLOGIA

O delineamento experimental foi subdividido em etapas preliminares para desenvolvimento da “cultura estoque” das espécies de microalgas e caracterização do efluente utilizado no cultivo e as etapas do cultivo em reatores, o monitoramento da densidade de microalgas, remoção da matéria orgânica e nutrientes e as etapas subsequentes para extração de óleo.

4.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Para realização dos experimentos foram necessárias etapas preliminares que foram comuns para avaliação da densidade celular das microalgas e a produção lipídica. Sendo assim, as etapas preliminares foram subdivididas da seguinte forma: o desenvolvimento de cultura estoque das espécies de microalgas *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, a caracterização do efluente utilizado como meio de cultura e a avaliação da remoção dos compostos presentes no efluente após o cultivo através da determinação das eficiências.

Nos experimentos de cultivo de microalgas, foram utilizados reatores com volume de 2 litros (com utilização de 1,8 litros), usando os efluentes coletados pós-UASB, pós-filtro biológico aerado submerso e pós-decantador secundário da Estação de Tratamento de Esgoto– ETE Centro.

Para o desenvolvimento dos experimentos de cultivo, os seguintes aspectos foram avaliados: (1) o metabolismo do cultivo (autotrófico, mixotrófico – por meio de variações nos períodos de iluminação e no caso do heterotrófico, avaliar a ausência de iluminação), (2) três espécies de microalgas (*Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*) (3) diferentes efluentes utilizados como meio de cultivo que foram coletados em etapas de tratamento na ETE Centro, (4) inóculo inicial de microalgas (5) interferência da presença microorganismos predadores no cultivo, com realização da autoclavagem e filtração do efluente, (6) redução da concentração de nutrientes ao longo do cultivo (7) cultivo com algas suspensas e imobilizadas.

Durante a realização dos experimentos de cultivo ocorria a avaliação da densidade celular através da contagem das células em microscópio para construção das curvas de crescimento. Após a execução dos experimentos supracitados, a biomassa era coletada para

realização das análises de produção de lipídios totais e remoção de nutrientes e matéria orgânica residual dos efluentes que foram utilizados como meio de cultivo.

4.2 DETALHAMENTO DAS ETAPAS PRELIMINARES

As etapas preliminares foram necessárias para desenvolver a cultura estoque das espécies de microalgas, produzindo a biomassa que seria posteriormente utilizada para o cultivo em reatores com os efluentes das três etapas de tratamento da ETE Centro (pós- UASB, pós-filtros biológico aerado submerso e pós-decantador secundário).

4.2.1 Desenvolvimento da “cultura estoque”

Para o desenvolvimento da “cultura estoque”, a partir de cepas puras das espécies *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris*, foram utilizadas as coleções do Laboratório de Produção de Alimento Vivo (LAPAVI), da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), como também da coleção do Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). As cepas puras foram transferidas para erlenmeyers de 500 mL, com adição de meio de cultura sintético contendo fontes de nitrogênio, fósforo, metais em concentrações traço, para isso, foi utilizado o meio de cultura ASP2 (PROVASOLI et al., 1957), além da vitamina do complexo B (B7 e B12) e água filtrada e clorada, utilizando hipoclorito de sódio em pó para cloração e a descloração com tiosulfato de sódio, além da aplicação da aeração.

Tabela 1 - Composição do meio Provazzoli® adaptado e solução de vitaminas do complexo B

Componente	Concentração
H ₃ BO ₃	1,93 g.L ⁻¹
FeCl ₃	0,053 g.L ⁻¹
MnSO ₄ .H ₂ O	0,273 g.L ⁻¹
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,0367 g.L ⁻¹
CO ₂ SO ₄ .7H ₂ O	0,008 g.L ⁻¹
Solução de EDTA 0.5 M	11,4 mL ⁻¹
Solução de Biotina (B7)	0,01 mL.L ⁻¹
Solução de Cianocobalamina (B12)	0,01 mL.L ⁻¹

Fonte: PROVASOLI et al., 1957.

A temperatura do ambiente foi mantida constante, aproximadamente 25°C e a medição foi realizada por termômetro instalado no laboratório. A iluminação foi realizada através de lâmpadas fluorescentes, com a manutenção de luminosidade em aproximadamente $\pm 2.300\text{lux}$ e a medição da intensidade de luz, através do luxímetro digital.

Para realização do procedimento de replicagem, as células deveriam estar em sua fase exponencial de crescimento, ou seja, numa concentração de aproximadamente 10^6 cel/mL^{-1} , para que se assegurasse a sua sobrevivência na etapa de replicagem seguinte. Dessa forma, a replicagem foi realizada a cada 5-7 dias. A replicação era necessária para promover a renovação das células, reposição do meio de cultura e das vitaminas do complexo B, que eram consumidas pelas microalgas. À medida que o cultivo se desenvolvia, era necessária a transferência do líquido para frascos de vidro de maiores volumes (2 a 20 litros), e assim, manter uma “cultura estoque” adequada para ser posteriormente utilizada nos cultivos com o efluente doméstico.

Para efeitos de mistura da cultura, foram utilizadas bombas de aquário simples, ligadas a mangueiras de silicone e acopladas aos frascos de vidro, para promover o borbulhamento de ar (0,2 L/min) para evitar a sedimentação das células. Na Figura 7 estão demonstradas as garrafas contendo as culturas estoques em laboratório.

Figura 7– Culturas estoques das espécies de microalgas em desenvolvimento.



Fonte: A Autora, 2016.

4.2.2 Caracterização do efluente utilizado como meio de cultivo

A Estação de Tratamento de Esgoto Centro- Petrolina-PE (coordenadas geográficas Latitude 9°24'7.88"S e Longitude 40°28'19.23"O) foi à unidade operacional escolhida para a coleta dos efluentes utilizados nos experimentos de cultivo algal. A ETE Centro é composta por tratamento preliminar, através de gradeamento, 4 (quatro) reatores UASB (*upflow anaerobic sludge blanket* ou reator anaeróbio de fluxo ascendente e manta de lodo), seguido de

03(três) filtros biológicos aerados submersos, 03(três) decantadores secundários e tanque de contato para desinfecção do efluente tratado, através da aplicação de cloro gasoso. A ETE Centro iniciou a operação em dezembro de 2014 pela Companhia Pernambucana de Saneamento—COMPESA.

Na Tabela 2, estão demonstrados os dados de projetos das etapas de tratamento, que foram dimensionadas para uma vazão média de 186 L/s e a vazão máxima de 364 L/s, carga de DBO de 7.980 kg/dia, concentração de DBO de 419 mgO₂/L, carga de DQO 15.776 kg/dia, concentração de DQO 882 mgO₂/L.

Tabela 2 - Dados da ETE-Centro, Município de Petrolina, PE.

Dados de Projeto	UASB	Filtro Biológico Aerado Submerso	Decantador secundário	Tanque de contato
Comprimento (m)	23,6	18,0	11,0	24,0
Largura (m)	24,6	18,0	11,0	6,0
Profundidade (m)	4,4	4,1	3,6	1,5
Volume (m ³)	2.554,5	1.328,4	1.376,5	216

Fonte: A Autora, 2016.

Para coleta das amostras de efluente que foram utilizadas como meio de cultivo das microalgas foram selecionados os seguintes pontos: esgoto pós-UASB, pós-filtro biológico aerado submerso (FAS) e pós-decantadores secundários (DS).

Os efluentes coletados para o desenvolvimento dos experimentos de cultivo de microalgas eram submetidos às seguintes análises laboratoriais: pH, oxigênio dissolvido (mg.L⁻¹), DQO (mg.L⁻¹), nitrogênio amoniacal (mg.L⁻¹), nitrogênio total (NTK) (mg-N.L⁻¹), fósforo total (mg.L⁻¹) utilizando as metodologias do *Standard Methods for Examination of Water and Wasterwater* (APHA, 2012). Nos experimentos em que esgoto utilizado como meio de cultivo foi filtrado, também foram realizadas as mesmas análises no efluente após processo de filtração.

No Quadro 4 estão demonstradas as análises laboratoriais realizadas e os respectivos métodos analíticos.

Quadro 4 - Análises, unidades e procedimentos analíticos que foram utilizados para caracterização do efluente da ETE Centro, Município de Petrolina, PE.

Análises	Unidades	Procedimentos analíticos
pH		Potenciométrico
Oxigênio Dissolvido (OD)	mg.L ⁻¹	Potenciométrico
DQO	mg.L ⁻¹	Colorimétrico
Fósforo Total	mg.L ⁻¹	Digestão por persulfato de Potássio e ácido ascórbico
Nitrogênio Amoniacal	mg.L ⁻¹	Titulométrico
Nitrogênio Total Kjeldahl	mg.L ⁻¹	Método de Kjeldahl

Fonte: A Autora, 2016.

As análises foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia Ambiental da Universidade Federal do Vale do São Francisco (LEA), no Laboratório de Esgoto da COMPESA – Gerência Regional de Negócios do São Francisco e no Laboratório de Saneamento Ambiental (LSA) da Universidade Federal de Pernambuco.

4.3 REALIZAÇÃO DOS CULTIVOS EM REATORES

No desenvolvimento dos cultivos em laboratório das espécies *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* com utilização de efluente doméstico das três etapas de tratamento da ETE Centro - pós-UASB, pós-FAS, pós-DS, foram avaliados: a densidade celular das microalgas a partir de modificações dos fatores físico-químicos e biológicos, conforme detalhamento nos subtópicos abaixo, com o intuito de avaliar quais fatores poderiam ser favoráveis para o aumento da densidade celular, a produção de lipídios e paralelamente avaliar a capacidade de reduzir os nutrientes e a matéria orgânica residual dos efluentes utilizados como meio de cultivo.

4.3.1 Avaliação do metabolismo

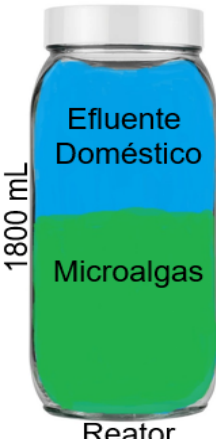
Para avaliação da interferência do metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico nos cultivos de microalgas foi verificada a influência da exposição e a não exposição das espécies de microalgas à luz artificial. No cultivo autotrófico foi realizada a iluminação

constante com uso de lâmpadas fluorescentes ($\pm 2,300 \text{ lux}$). No metabolismo heterotrófico não foi utilizada iluminação e para que a luz do ambiente não interferisse no experimento, os reatores foram cobertos por papel alumínio. No metabolismo mixotrófico foram utilizadas lâmpadas fluorescentes com temporizador para um intervalo de 12 horas com luz e 12 horas sem luz.

4.3.2 Inóculo inicial de microalgas

A proporção entre inóculo inicial de microalgas e o efluente também foi avaliada para verificar se existiriam diferenças no crescimento das microalgas e produção lipídica e também se haveria diferença estatística significativa para esta variável. Foram desenvolvidos cultivos com diferentes inóculos iniciais de microalgas (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%) em relação ao volume total reator. Na Figura 8 estão apresentados os inóculos iniciais de microalgas que foram utilizados nos experimentos e as respectivas densidades celulares. De acordo com Lau, Xu e Wu (1996), o primeiro fator biótico que influencia significativamente o crescimento das microalgas é a densidade inicial espera-se que o quanto maior a densidade inicial de algas em um cultivo, melhor o crescimento e maior será eficiência de remoção de nutrientes. No entanto, a alta densidade de algas pode levar ao auto-sombreamento, uma acumulação de auto-inibidores e uma redução na capacidade fotossintética (Fogg, 1975; Darley, 1982).

Figura 8 - Inóculos iniciais de microalgas em relação ao volume total do reator e do efluente utilizado como meio de cultivo.



	Concentração (%)	Volume de Microalga (mL)	Volume de Efluente (mL)	Densidade Celular média (cel/mL)
5	90	1.710	$5,20 \times 10^5$	
10	180	1.620	$8,2 \times 10^5$	
20	360	1.440	$1,14 \times 10^6$	
30	540	1.260	$1,95 \times 10^6$	
40	720	1.080	$2,51 \times 10^6$	
50	900	900	$3,53 \times 10^6$	

Fonte: A Autora, 2018.

4.3.3 Diferentes tipos de efluentes utilizados no cultivo

As etapas de tratamento - pós-UASB, pós-FAS e pós-DS, foram avaliadas para determinar se as características físico-químicas dos efluentes coletados no sistema de tratamento de esgoto teriam alguma influência sobre a densidade celular e produção lipídica. Ou seja, se as concentrações de matéria orgânica e nutrientes dos efluentes destas etapas de tratamento exerceriam efeitos sob a produtividade das algas.

4.3.4 Avaliação da interferência da presença microrganismos predadores no cultivo

Para análise da possível interferência da predação e/ou competição das microalgas por microrganismos presentes no esgoto (rotíferos, protozoários, bactérias e etc.) utilizado como meio de cultivo foi testada a aplicação do efluente após autoclavagem a 121°C (1 atm; pressão relativa) durante 15 minutos, para eliminação destes microrganismos. Também foi testada a utilização de filtração com membranas para avaliar a remoção dos microrganismos e influência de partículas em suspensão no efluente utilizado como meio de cultivo. Para filtração foi utilizada membrana de fibra de acetato de celulose de 47 mm com poro 0,45 µm, com utilização de bombas de filtração à vácuo, conforme descrito por Unnithan, Unc e Smith (2014).

4.3.5 Redução da concentração de nutrientes no efluente utilizado como meio de cultivo

A redução da concentração de nutrientes ao longo do cultivo foi avaliada a partir de análise da remoção de compostos nitrogenados (NTK e NH_4^+) e fósforo total nos efluentes utilizados dos experimentos, a partir da coleta de alíquotas das amostras e realização das análises laboratoriais para verificar se a redução da concentração dos nutrientes estaria relacionada com aumento ou diminuição da densidade celular e da produção lipídica. De acordo com Xin et al. (2010), com limitação de nitrogênio amoniacal em concentrações a partir de 2,5 mg.L^{-1} e fósforo a partir de 0,1 mg.L^{-1} no meio de cultivo, já pode ocorrer incremento do rendimento lipídico intracelular, devido as mudanças metabólicas, nas quais, ocorre a diminuição da formação de compostos protéicos e clorofilados das células, e consequentemente sua taxa de multiplicação, afetando o crescimento e a produtividade, e por outro lado, ocorre acréscimo na produção de substâncias de reserva no interior da célula, tais como carboidratos, produzidos nos primeiros dias de escassez, ou lipídeos, produzidos posteriormente, nos quais os organismos se utilizam em casos de depleção prolongada de nutrientes no meio, garantindo assim, a sobrevivência e manutenção celular.

4.3.6 Células suspensas e imobilizadas

Foi avaliada a influência da remoção de nutrientes, matéria orgânica residual e produção lipídica, comparando o cultivo com células de microalgas suspensas e células imobilizadas em gel polimérico à base de alginato de sódio.

Para imobilização das células de microalgas, uma solução de alginato de sódio 4% foi preparada, autoclavada e posteriormente misturada ao cultivo de microalgas numa proporção 1:1. Os “beads” foram formados com auxílio de uma pipeta volumétrica de 25 mL, ajustada para gotejar a solução dentro de um béquer contendo solução de cloreto de cálcio 0,4M, conforme metodologia descrita por Zhang et al. (2008).

O cultivo comparando as células suspensas e imobilizadas foi realizado também em reatores com volume de 2 litros (utilizando 1,8 litros para o experimento), onde foi realizada a contagem das células para a aplicação da mesma densidade no cultivo com células suspensas e para imobilização das microalgas.

Após a realização do cultivo foi executada a separação das células suspensas do efluente através da centrifugação do líquido em 2.500 rpm por ± 2 minutos para as células imobilizadas foi utilizadoo funil de decantação para colheita dos “beads”.

Para realização das análises de lipídios foi necessário dissolver o gel polimérico à base de alginato de sódio e assim foi utilizado bicarbonato de sódio para que a biomassa fosse utilizada para quantificação dos lipídios produzidos, também seguindo a metodologia descrita por Zhang et al., (2008). O efluente após a separação das microalgas foi utilizado para avaliação da eficiência de remoção dos nutrientes e matéria orgânica residual nos cultivos com células suspensas e imobilizadas, fazendo uma comparação do tipo de cultivo que apresentou um maior percentual de redução da concentração dos compostos.

4.4 MONITORAMENTO DA DENSIDADE E CRESCIMENTO CELULAR DE MICROALGAS

Durante a realização dos cultivos, diariamente era retirada uma alíquotapara contagem das células em microscópio óptico para avaliação da densidade celular e da taxa de crescimento das microalgas através das contagens de transectos em câmara de Neubauer espelhada (3 x 3 mm x 0,1 mm de profundidade). A contagem das células foi realizada em duplicata com aumento 400x, para que posteriormente, durante a avaliação dos resultados, fossem analisados os resultados após o cálculo da média das contagens.

Figura 9 - Câmera de Neubauer espelhada, esquema de transecto e microscópio óptico.

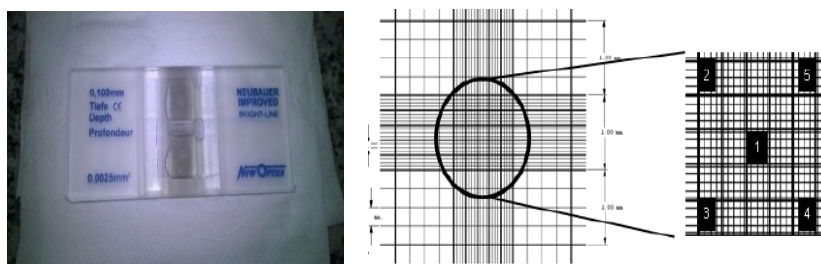


Figura 10 - Microscópio óptico



Fonte: A Autora, 2015.

Para cálculo do número total de células por mililitro de amostra, utilizou-se a fórmula descrita na Equação 1 abaixo.

Equação (1): $DC = n^{\circ} \text{ total de células} \times n^{\circ} \text{ de quadrantes contados} \times 10^4$

Para cálculo do número total de células por mililitro de amostra, utilizou-se a fórmula descrita na Equação 2, abaixo considerando o fator de diluição quando necessário.

Equação (2): $DC = \frac{n^{\circ} \text{ total de células}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times FD \times 10^4$

Onde DC corresponde a densidade celular ($n^{\circ} \text{ cel. mL}^{-1}$), FD corresponde ao fator de diluição quando necessário, e 10^4 corresponde a transformação de mm cúbicos em mL.

A densidade celular máxima, (DCM_{ax}) foi obtida por meio do maior valor correspondente a contagem celular. A densidade celular média (DCM_{ed}) foi obtida pela média das contagens entre o primeiro e último dia de experimento (T_1 e T_f).

A taxa crescimento das microalgas foram calculadas de acordo com Lourenço (2006).

(a) *Taxa de crescimento (r)*

A taxa de crescimento para microalgas, foi obtido por meio da Equação 3 a seguir:

Equação (3): $r = (\ln(N \div N_0) \div (t - t_0))$

Em que N corresponde a densidade celular num determinado tempo t (g. mL^{-1}), N_0 corresponde a densidade celular no tempo 0, e t equivale a tempo da análise (dias).

Para interpretação dos resultados das curvas de crescimento das microalgas foram utilizadas as fases de crescimento de uma cultura de microrganismos: fase lag, fase exponencial, fase estacionária, fase de decaimento.

4.5 REMOÇÃO DE NUTRIENTES E MATÉRIA ORGÂNICA RESIDUAL DO EFLUENTE UTILIZADO COMO MEIO DE CULTIVO

Após a execução dos experimentos de cultivo de microlalgas em efluentes domésticos das três etapas de tratamento da ETE Centro, a remoção dos nutrientes e matéria orgânica residual do efluente utilizado como meio de cultivo foi avaliada através das seguintes análises: DQO ($\text{mg-O}_2\text{.L}^{-1}$), nitrogênio amoniacal ($\text{mg-N-NH}_3\text{.L}^{-1}$), nitrogênio total Kjeldahl (NTK) (mg-

N.L⁻¹), fósforo total (mg/L⁻¹) utilizando as metodologias do *Standard Methods for Examination of Water and Wasterwater* (APHA, 2012). As amostras eram coletadas no último dia do experimento ou em intervalos de dias, de acordo com a etapa do experimento, para avaliação da eficiência de remoção ao longo do cultivo, como também para avaliação da redução dos nutrientes e as respostas das microlagas redução dos nutrientes ao longo do cultivo.

Para realização das análises dos compostos dissolvidos foi necessário realizar a centrifugação em 2.500 rpm por ± 2 minutos, para separação da biomassa e coleta do líquido.

4.6 COLHEITA E SECAGEM DA BIOMASSA

Como já mencionado anteriormente, foi utilizada a centrifugação para a colheita da biomassa dos cultivos.

Foram utilizados alguns procedimentos para secagem da fração sólida (biomassa algal): secagem ao sol, estufa e liofilização.

Na secagem ao sol, a biomassa era disposta em papel filme e ficava por 24 horas secando naturalmente. Na secagem utilizando a estufa, a biomassa foi colocada em cápsulas de porcelana e levada a estufa a 100°C durante aproximadamente 6 horas. A liofilização da biomassa úmida era através congelamento para posterior liofilização sob pressão de 10-1 mbar e temperatura do condensador de -40°C para que a amostra fosse sublimada retirando assim, a umidade. A secagem da biomassa foi necessária para facilitar a extração de óleos.

4.7 EXTRAÇÃO DO ÓLEO INTRACELULAR

Para extração do óleo contido dentro das células das microalgas, foi realizada a filtração de 100 mL dos cultivos utilizando membranas de fibra de vidro de 1,2 μ m. As membranas contendo a biomassa foram colocadas em Erlemeyers de 25 mL contendo 30 mL dos solventes avaliados separadamente. Os Erlemeyers foram tampados com plástico filme e imersos e fixados em equipamento ultrassom por 60 minutos.

A extração foi baseada na metodologia descrita por Blight e Dyer (1959), com a realização da extração dos óleos intracelulares por meio de uma mistura composta pelos solventes clorofórmio:metanol, na proporção (2:1 v/v). As membranas foram colocadas em cartuchos de celulose, e os solventes utilizados foram transferidos ao balão do Soxhlet, que receberam mais 150 mL de solvente. A temperatura na chapa aquecedora do equipamento

Soxhlet foi mantida em 60°C e o tempo de extração foi de aproximadamente 3 horas, totalizando 35 ciclos de extração para cada membrana. Todas as extrações foram realizadas em triplicata, para cada uma das espécies.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DO ÓLEO TOTAL

A conversão dos ácidos graxos aos seus derivados voláteis para respectiva identificação e quantificação foram realizadas segundo o método proposto por Indartiet al. (2005). A quantificação foi realizada aferindo-se o conteúdo total da solução óleo-solvente, e transferindo-se uma alíquota de 2 mL dessa solução a um tubo de vidro rosqueável com capacidade para 10 mL, onde evaporou-se o solvente em banho maria numa temperatura média de 55°C. Em seguida, os tubos foram secos em dessecador e pesados em balança analítica. O rendimento total de lipídeo foi obtido pela equação 4, sugerida por Lourenço (2006):

Equação (4):
$$Y(\%) = \frac{w_L}{w_{DA}}$$

Onde W_L corresponde ao peso do lipídeo (g), e W_{DA} , corresponde ao peso da biomassa que foi submetida ao processo de extração (g).

4.8.1 Esterificação, identificação e quantificação dos estéres metílicos de ácidos graxos (FAME's)

A identificação dos ácidos graxos foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas e a quantificação por detector de ionização de chama, segundo método proposto por Eli et al. (2011). É importante o conhecimento em relação aos lipídios formados, pois as características dos ácidos graxos que compõem os lipídios são determinantes para as propriedades do biodiesel, assim como seu processo de obtenção.

Foram utilizados os mesmos tubos contendo óleo obtido de quantificação. Adicionou-se aos tubos contendo óleo, 2 mL de uma solução de ácido sulfúrico a 10% em metanol e 2 mL de clorofórmio PA. Os tubos foram devidamente vedados, e então foram submetidos a aquecimento por 30 minutos a 90 °C. Após aquecimento, os tubos foram cobertos em papel alumínio até que alcançassem temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado aos tubos 1 mL de água ultrapura, e então foram submetidos a centrifugação na velocidade de 2500 rpm

por 3 minutos, e logo foram deixados em repouso por 30 minutos para possibilitar a separação das fases oleica e aquosa.

Uma alíquota da porção oleica (0,5 mL) foi retirada do tubo com auxílio de uma pipeta automática e adicionada à *viels* estéreis próprios para cromatografia (lavados em ácido nítrico 10% e água ultrapura). Para determinação dos FAMES em cromatografia gasosa com espectrômetro de massa, foi implantado método cromatográfico específico, utilizando padrões primários de ácidos graxos desde C07:0 a C24:0 (Merk). Os padrões primários foram diluídos em balões individuais de 10 mL com clorofórmio para se obter as soluções estoques de cada composto, estas com concentrações de 10.000 e 100.000 mg.L⁻¹.

Em seguida, num único balão, com capacidade de 25 mL que corresponde a 2500 µL (para as soluções estoque com concentração de 10.000 mg.L⁻¹) ou 250 µL (para as soluções estoque com concentração de 100.000 mg.L⁻¹), foram diluída solução estoque de cada composto com clorofórmio, para se obter a solução mãe de cada composto, com concentração de 1000 mg.L⁻¹ de cada. Posteriormente, foram diluídos em *viels* de 1,5 mL, diferentes alíquotas da solução mãe, utilizando clorofórmio, para o volume final de 1mL, a fim de se obter os padrões de calibração. O procedimento foi realizado em duplicata.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente foi aplicado o teste estatístico de Shapiro-Wilk para avaliar se os experimentos tinham distribuição “Normal”. Neste teste, a hipótese nula é que a população é normalmente distribuída, ou seja, se o valor “p” for menor que o nível alfa escolhido. A hipótese nula é rejeitada e há evidências de que os dados testados não são normalmente distribuídos. Por outro lado, se o valor “p” for maior que o nível alfa escolhido, a hipótese nula de que os dados provêm de uma população normalmente distribuída não pode ser rejeitada. O nível alfa escolhido foi de 0,05, e o conjunto de dados apresentou um p-valor menor que 0,05, o que fez rejeitar a hipótese nula, de que os dados são de uma população normalmente distribuída

Após a confirmação de que os dados não apresentavam uma distribuição normal, foi utilizado o programa Graphprism 7 para execução de testes de Kruskal-Wallis para avaliação e comparação dos resultados de crescimento celular para cada tipo de variável que foi testada, ou seja, metabolismos (autotrófico, heterotrófico e mixotrófico), espécies de microalgas, inóculo inicial de microalgas, interferência da presença de microrganismos predadores no cultivo e

diferentes características de efluente utilizado como meio de cultivo, de acordo com a coleta dos efluentes em três etapas de tratamento da ETE Centro.

O teste de Kruskal-Wallis foi escolhido, pois, quando são violadas de forma importante as pressuposições de normalidade e homocedasticidade, não se pode confiar no resultado de uma análise de variância tradicional, pois, a probabilidade de se cometer um erro do Tipo I afasta-se marcadamente de α . A alternativa não paramétrica para ANOVA a um critério de classificação é o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis. Este teste é uma generalização do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney (WMW) e serve, portanto, para se compararem duas ou mais populações quanto à tendência central dos dados (CALLEGARI-JACQUES, 2003). O teste de Kruskal-Wallis é utilizado na comparação de três ou mais amostras independentes. Ele indica se há diferença entre pelo menos dois deles. A aplicação do teste utiliza os valores numéricos transformados em postos e agrupados num só conjunto de dados. A comparação dos grupos é realizada por meio da média dos postos.

Também foi aplicado o teste de Dunn para realizar múltiplas comparações entre os dados, quando o teste de Kruskal-Wallis apontou que a hipótese de nulidade (H_0) foi rejeitada. Com o teste de Dunn, era possível determinar quais dos grupos foram diferentes, podendo-se testar dois grupos e determinar se foram eles os responsáveis pela rejeição de H_0 . Os resultados os testes estatísticos estão apresentados nos ANEXOS.

4.10 ETAPAS DE DESENVOLVIMENTO DOS EXPERIMENTOS

Para o desenvolvimento dos cultivos foi realizada a divisão do trabalho em etapas:

- Etapa 1: Cultivo com a espécie *Desmodesmus subspicatus* e efluentes pós- decantador secundário (DS);
- Etapa 2: Cultivo com a espécie *Desmodesmus subspicatus* e efluente pós-filtro biológico aerado submerso (FAS);
- Etapa 3: Cultivo com as espécies *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chorella vulgaris* isoladamente e efluente pós-UASB;
- Etapa 4: Cultivo com as espécies *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chorella vulgaris* com células suspensas e imobilizadas e efluentes pós-UASB e pós-filtro biológico aerado submerso (FAS).

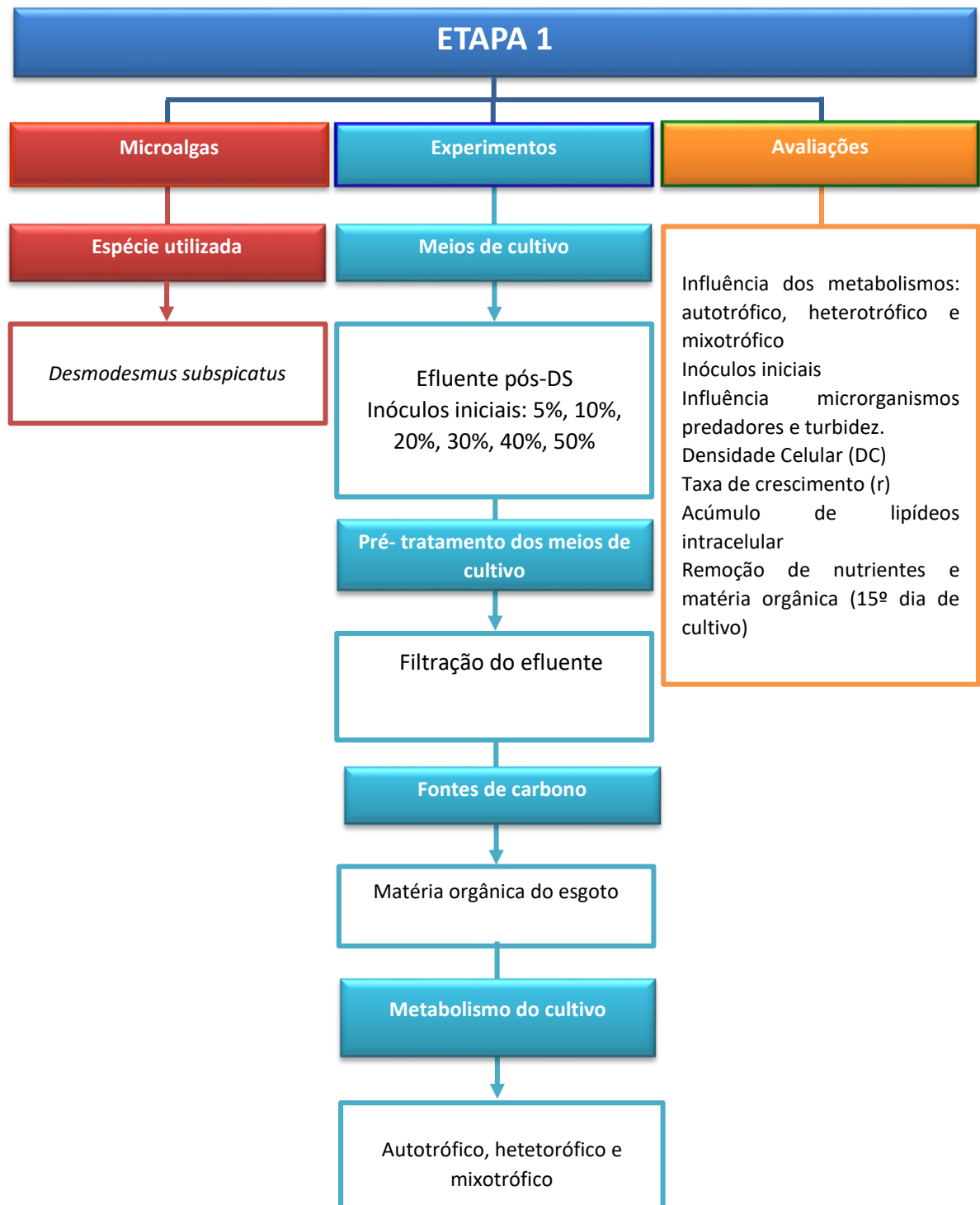
Na primeira e segunda etapas foi avaliada apenas a espécie *Desmodesmus subspicatus* em decorrência da recente classificação taxônômica como um gênero e consequentemente dos poucos estudos científicos desta espécie em cultivos com efluentes domésticos para remoção de nutrientes, matéria orgânica residual e produção lipídica. Na terceira etapa foram avaliadas também as espécies *Scenedesmus obliquus* e *Chorella vulgaris* em cultivos isolados com o objetivo de comparar o desempenho das três espécies na remoção dos nutrientes e matéria orgânica residual presentes nos efluentes e também a produção de lipídios. Na quarta etapa também foram avaliadas as três espécies isoladamente em cultivos com células suspensas e imobilizadas com intuito de verificar a aplicabilidade das células imobilizadas devido a facilidade de colheita da biomassa neste tipo de cultivo.

4.10.1 Etapa 1: Cultivo com a espécie *D. subspicatus* e efluente pós-DS com e sem filtração

Primeiramente foram realizadas coletas do esgoto pós-DS na ETE-Centro para o cultivo em laboratório apenas da espécie *D. subspicatus*. A duração do cultivo foi de 15 dias e no último dia de experimento houve a centrifugação para separação da biomassa e realização das análises laboratoriais com objetivo de avaliar a eficiência de remoções de matéria orgânica residual e nutrientes. A biomassa foi utilizada para avaliação da produção de lipídios totais.

Foram avaliados os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, comparando os inóculos iniciais de microalgas (5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%). Também foi avaliada a interferência de microrganismos predadores e das partículas em suspensão comparando a utilização do efluente com filtração e sem filtração. Na Figura 11 estão demonstradas as condições de cultivo executadas na etapa 1.

Figura 11-Condições de cultivo da espécie *D. Subspicatus* na etapa 1 do experimento.

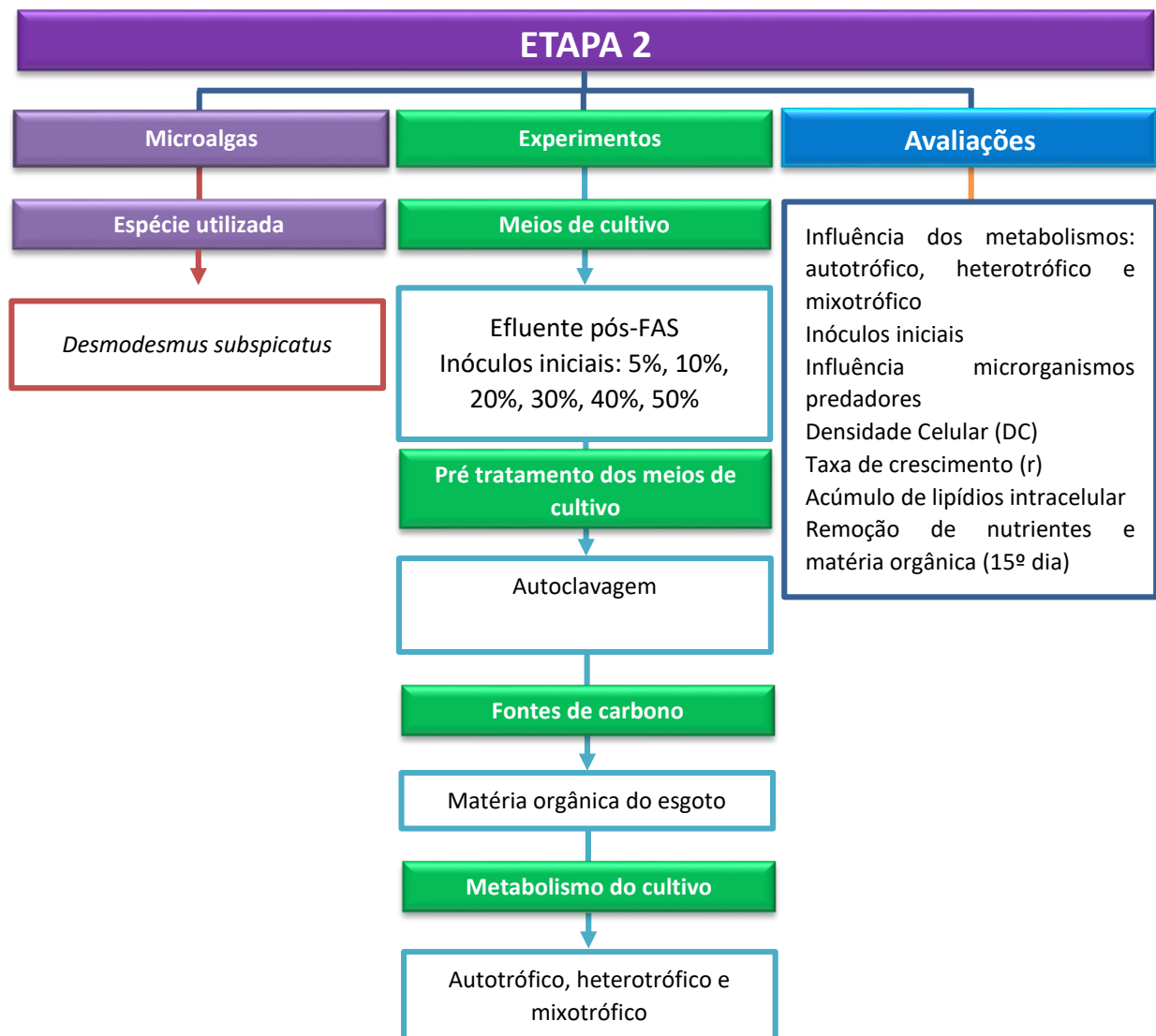


Fonte: A Autora, 2018.

4.10.2 Etapa 2: Cultivo com a espécie *D. subspicatus* em efluentes pós-FAS com e sem autoclavagem

Foram realizadas coletas do esgoto pós-FAS para o cultivo da espécie *D. subspicatus*, considerando os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, comparando os inóculos iniciais de microalgas (5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%). Também foi avaliada a interferência de microrganismos predadores que poderiam estar presentes no efluente utilizado como meio de cultivo, para isto, foi realizada a esterilização do efluente utilizando o autoclave. Foi realizada avaliação da remoção de nutrientes, matéria orgânica e a produção lipídica após a separação da biomassa de algas do efluente. Na Figura 12 estão demonstradas as condições de cultivo executadas na etapa 2.

Figura 12 - Condições de cultivo da espécie *D. Subspicatus* na etapa 2 do experimento.



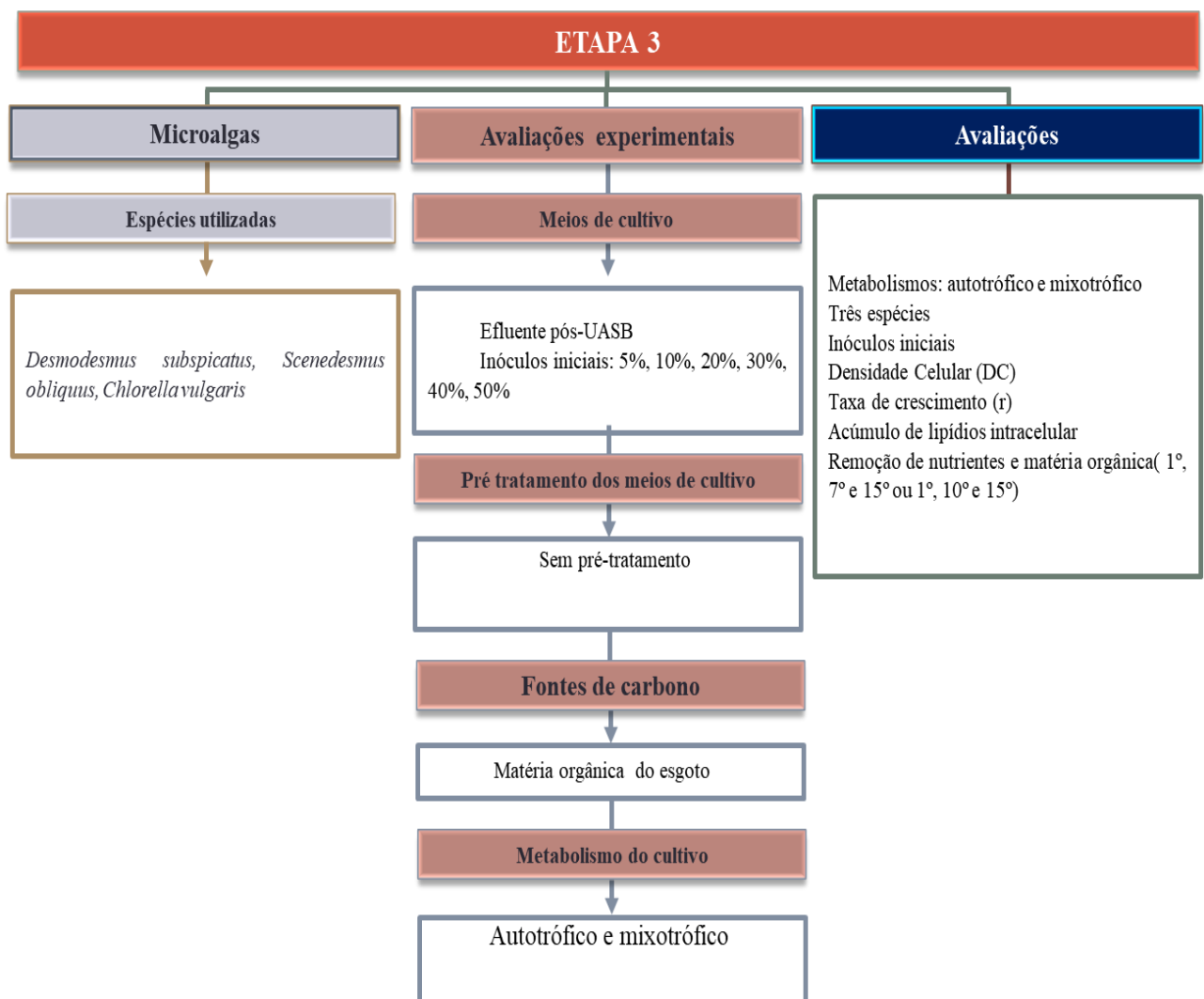
Fonte: A Autora, 2016.

4.10.3 Etapa 3: Cultivo com as espécies *D. subspicatus*, *C. vulgaris* e *S.obliquus* e efluente pós-UASB

Foram realizadas coletas do esgoto pós-UASB para o cultivo das espécies *D.subspicatus*, *S. obliquus* e *C.vulgaris* e nesta etapa foram considerados apenas os metabolismos autotrófico e mixotrófico, comparando os inóculos iniciais de microalgas de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

Nesta etapa não foram realizadas a autoclavagem ou filtração dos efluentes utilizados no cultivo. Foram realizadas avaliações da remoção de nutrientes, matéria orgânica residual e produção lipídica. Na Figura 13 estão demonstradas as condições de cultivo executadas na etapa 3.

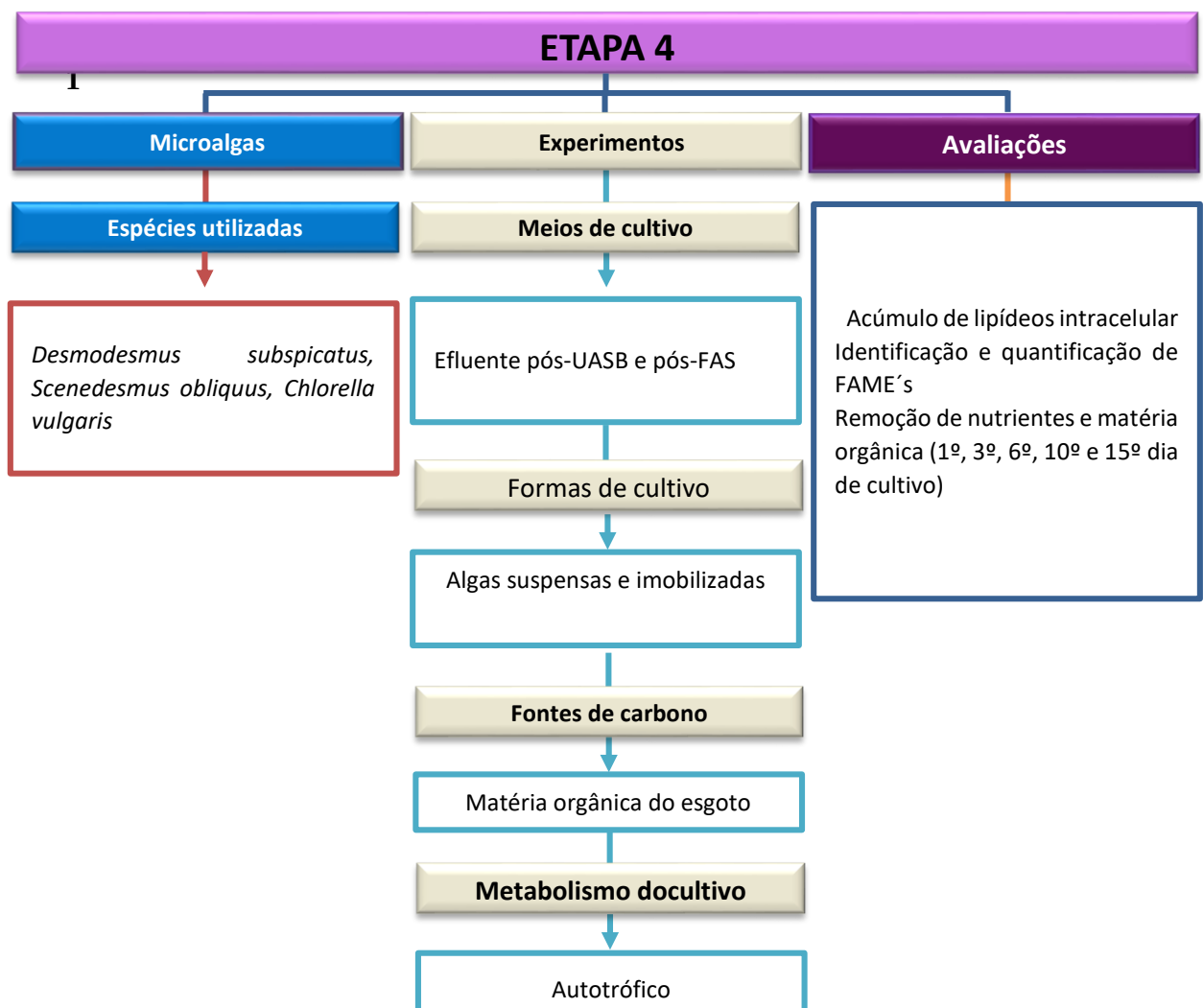
Figura 13 - Condições de cultivo das espécies de microalgas, *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* na etapa 3 do experimento.



4.10.4 Etapa 4: Cultivo com a espécie *Dsubspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com células suspensas e imobilizadas e efluentes pós-UASB e pós-FAS

Foi realizado um experimento comparando células suspensas e imobilizadas considerando apenas o metabolismo autotrófico e utilizando as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* e o esgoto pós-UASB e pós-FAS sem utilização de pré-tratamento para remoção de organismos predadores. Foram avaliadas as eficiências de remoção de matéria orgânica residual e nutrientes, conteúdo lipídico nas células das três espécies cultivadas de forma suspensa e imobilizada e houve a identificação e quantificação de FAMES.

Figura 14 - Condições de cultivo das espécies de microalgas, *D.subspicatus*, *S.obliquus* e *C.vulgaris* com células suspensas e imobilizadas na etapa 4 do experimento.



Fonte: A Autora, 2016.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram desenvolvidas quatro etapas independentes para avaliação do cultivo de microalgas em efluentes domésticos para análise da remoção de matéria orgânica residual, nutrientes e produção de lipídios.

5.1 ETAPA 1 – AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA ESPÉCIE *D. SUBSPICATUS* EM EFLUENTE PÓS-DS COM E SEM FILTRAÇÃO

Para realização da etapa 1 do experimento foi utilizada a espécie *Desdesmuus subspicatus* com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% utilizando o efluente pós-decantador secundário com e sem filtração.

5.1.1 Crescimento da espécie *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em efluente pós-DS com e sem filtração

A Tabela 3 apresenta os resultados das medições de pH, oxigênio dissolvido (mg/L), temperatura (°C) e condutividade (µS/cm) do efluente coletado após tratamento no decantador secundário (DS), que foi utilizado como meio de cultivo nesta etapa do experimento.

Tabela 3 - Resultados de medições do efluente pós-DS na ETE Centro, Petrolina, PE.

Efluente	pH	Temperatura(°C)	OD (mg.L ⁻¹)	Condutividade(µS/cm)
Pós-DS	7,3	31,9	0,2	1.199,5

Fonte: A Autora, 2015.

A Tabela 4 apresenta as características do efluente pós-DS com os resultados das análises de DQO, NTK, N-amoniaco e fósforo total.

Tabela 4 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-DS na ETE centro.

Efluente	DQO mg.L ⁻¹	NTK mg.L ⁻¹	N-amoniaco mg.L ⁻¹	Fósforo Total mg.L ⁻¹
Pós-DS sem filtração	136,7 ±12,72	48,4±8,76	36,4±3,95	20,1±7,77
Pós-DS com filtração	129,3± 9,19	46,25±8,69	32,5±4,31	25,7±8,20

Fonte: A Autora, 2016.

Foram avaliados os cultivos com inóculos iniciais de microalgas 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em relação ao volume útil total do reator e para isto foi realizada a contagem das células na montagem dos experimentos. Foi também testada a influência da filtração do efluente utilizado no cultivo. Sendo assim, neste experimento, foram avaliadas 36 variáveis, utilizando 72 reatores, já que este procedimento foi realizado em duplicata.

A Figura 15 demonstra a avaliação do crescimento de *D. subspicatus* comparando os inóculos iniciais de microalga supracitados, utilizando o metabolismo autotrófico e com efluente filtrado. Os cultivos que apresentaram as maiores DCM_{ax} foram com os inóculos iniciais de 5% e 50%. No cultivo com 5%, a fase exponencial iniciou a partir do 3º dia de cultivo e a DCM_{ax} foi no 9º dia de cultivo, com $2,81 \times 10^7$ cel/mL. O cultivo com 50% apresentou uma curva de crescimento exponencial a partir do 4º dia de cultivo e atingiu seu pico de crescimento no 7º dia, apresentando $2,98 \times 10^7$ cel/mL, e após este dia, ocorreu uma queda na densidade celular, provavelmente em decorrência do rápido consumo de nutrientes e matéria orgânica, como também pela presença de microrganismos predadores. No cultivo com 10%, a maior densidade celular foi verificada no 10º dia com $1,45 \times 10^7$ cel/mL. Também foi detectada a presença de rotíferos e protozoários no cultivo. No cultivo com 20%, a fase lag da curva durou até o 8º dia, quando ocorreu um pico de densidade celular no 10º dia de cultivo com ($2,33 \times 10^7$ cel/mL), seguido de uma queda acentuada a partir do 11º dia ($7,10 \times 10^6$ cel/mL), que também pode estar relacionada com a herbivoria, devido à presença de rotíferos e protozoários no cultivo, que foi identificado através da visualização ao microscópio. No cultivo com 30%, a DCM_{ax} ocorreu no 5º dia, com densidade de $1,8 \times 10^7$ cel/mL. No cultivo com 40%, a DCM_{ax} ocorreu no 8º dia com $1,6 \times 10^7$ cel/mL.

A Figura 16 apresenta as densidades celulares dos seis inóculos iniciais com o efluente sem filtração. Também foi possível observar que as maiores DCM_{ax} foram nos cultivos com 50% e 5% de inóculos iniciais, atingindo $2,80 \times 10^7$ cel/mL e $2,25 \times 10^7$ cel/mL, respectivamente. A DCM_{ax} observada no cultivo a 10% foi de $1,67 \times 10^7$ cel/mL, no 10º dia de cultivo e depois houve a fase de declínio da curva de crescimento. O cultivo a 20%, apresentou curva de crescimento com fase lag até o 7º dia e a partir do 8º dia houve um crescimento exponencial ($1,32 \times 10^7$ cel/mL), com uma queda brusca a partir do 11º dia, provavelmente ocasionada pela herbivoria e também pela redução na disponibilidade de nutrientes.

Figura 15 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo autotrófico, em efluente com filtração.

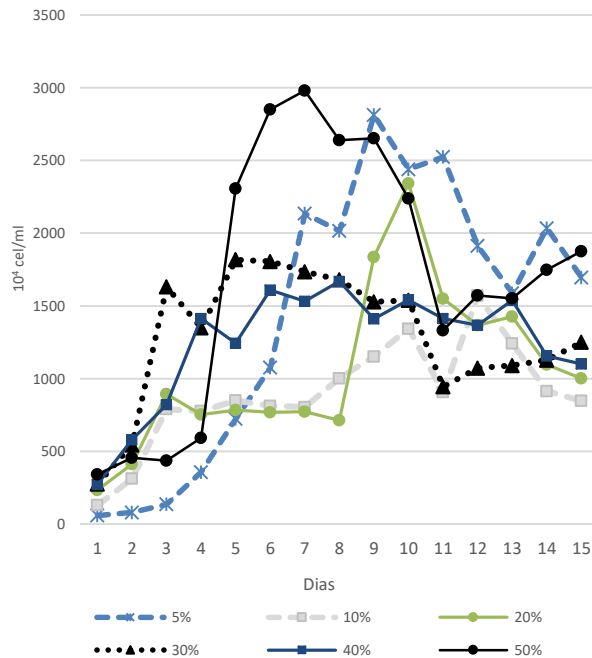
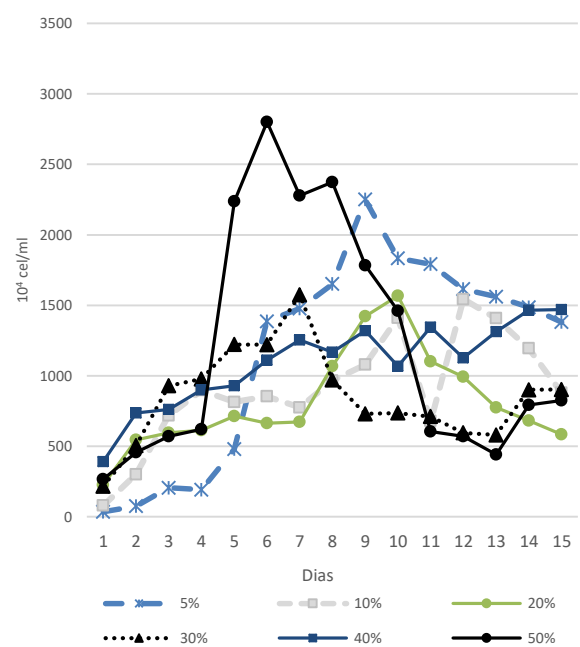


Figura 16 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com os inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo autotrófico, em efluente sem filtração.



O cultivo com inóculo inicial de 30%, a DCM_{ax} ocorreu no 7º dia com $1,57 \times 10^7$ cel/mL, seguido de uma queda brusca nos dias posteriores. Já o cultivo a 40% apresentou uma curva de crescimento irregular com alguns eventos de decréscimo da densidade, seguido de pequenos aumentos, em dias consecutivos e no 14º dia de cultivo ocorreu a DCM, $1,46 \times 10^7$ cel/mL. Também foram visualizados organismos predadores nos cultivos, conforme Figura 17.

Figura 17 - Presença de organismos predadores no cultivo.



Fonte: A Autora, 2015.

Gressler et al. (2013) estudou o cultivo de *Desmodesmus subspicatus* com metabolismo autotrófico em fotobioreator tubular para biorremediação de águas residuárias e produção de óleo. No cultivo com adição de CO₂ a fase estacionária foi atingida com 7 dias de cultivo e sem a introdução de CO₂ era necessário um tempo de cultivo seis dias, chegando à fase estacionária entre os quatro e seis dias. A máxima densidade celular foi de $9,11 \times 10^6$ células/mL foi obtida durante o cultivo sem CO₂, e estes valores subiram para $4,24 \times 10^7$ células/mL quando CO₂ foi adicionado ao cultivo. Comparando com os resultados da presente pesquisa, onde não foi adicionado CO₂ nos experimentos, valores de DCM_{ax} foram superiores quando comparados a da pesquisa citada.

Para avaliar a existência de diferenças estatísticas significativas nos resultados de densidade celular do cultivo autotrófico, considerando a variável de filtração ou não do efluente, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$), com múltiplas comparações através do teste de Dunn. Com o resultado do teste, foi possível concluir que não houve diferença estatística significativa quando se comparou a variável filtração do efluente, como também não houve diferença quando se avaliou os inóculos iniciais das microalgas no cultivo (5%, 10%, 20% 30%, 40% e 50%), apesar dos cultivos com 5% e 50% apresentarem maiores DC_{Max} e DC_{Média}. Desta forma, a filtração do efluente não surtiu efeito sobre a densidade celular e também não houve diferença estatística quando comparou-se os inóculos iniciais de microalgas no cultivo.

Existem na literatura alguns procedimentos de pré-tratamento de águas residuárias antes de entrar em um processo de cultivo de microalga que incluem filtração, autoclavagem ou diluição da água, o que pode diminuir o crescimento de microrganismos competitivos e diminuir a turbidez da água, enquanto aumenta a transmitância da luz (UNNITHAN; UNC; SMITH, 2014). Contudo, no experimento realizado e a partir da avaliação dos resultados dos testes estatísticos, foi possível concluir que a filtração do efluente não proporcionou diferença

significativa no crescimento da espécie *D. subspicatus*. Diante dos resultados, é possível concluir que a filtração não foi eficiente para remoção de microrganismos predadores, já que foi possível verificar a presença de rotíferos e protozoários durante a realização das contagens de microalgas no microscópio e houve também uma drástica redução da densidade celular. A filtração para redução dos sólidos em suspensão e aumento da transmitância da luz também não trouxe benefícios para o acréscimo da densidade celular, considerando as condições de cultivo aplicadas neste experimento. Em quase todos os ambientes aquáticos naturais, a herbivoria por ciliados, amebas, rotíferos e outros zooplânctons formam um aspecto-chave da cadeia alimentar e, como tal, influenciam significativamente os ecossistemas e são críticos para o funcionamento eficiente.

Na Tabela 5 estão demonstrados os dados de taxa de crescimento da espécie *D. subspicatus* com o metabolismo autotrófico. A maior taxa de crescimento foi verificada no cultivo com 50% de inóculo inicial e efluente sem filtração (1,283 dia⁻¹).

Tabela 5 - Taxa de crescimento de *D. subspicatus* nos cultivos autotróficos com inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.

Experimentos	Taxa de crescimento
Autotrófico	
5% com filtração	0,722 dia ⁻¹
5% sem filtração	0,884 dia ⁻¹
10% com filtração	0,902 dia ⁻¹
10% sem filtração	0,810 dia ⁻¹
20% com filtração	0,594 dia ⁻¹
20% sem filtração	1,001 dia ⁻¹
30% com filtração	0,887 dia ⁻¹
30% sem filtração	0,787 dia ⁻¹
40% com filtração	0,548 dia ⁻¹
40% sem filtração	0,632 dia ⁻¹
50% com filtração	0,477 dia ⁻¹
50% sem filtração	1,283 dia ⁻¹

Fonte: A Autora, 2015.

Franchino et al. (2013) avaliou o cultivo de 3 espécies de microalgas (*Neochloris oleoabundans*, *Chlorella vulgaris* e *Scenedesmus obliquus*) com metabolismo autotrófico e cultivadas em efluente obtido a partir de um digestor anaeróbio de uma planta piloto utilizada para digerir esterco de proteína do leite, onde foram testadas quatro diluições (1:10, 1:15, 1:20, 1:25) do efluente para o cultivo das três cepas. As taxas de crescimento de *C. vulgaris* foram

0,64, 0,52, 0,51, 0,49 d^{-1} , as taxas de crescimento de *Scenedemus obliquus* foram 0,49, 0,49, 0,44, 0,31 e 0,23 d^{-1} e as taxas de crescimento de *N.oleoabundans* foram 0,27, 0,37, 0,30 e 0,26, d^{-1} . Diante dos resultados da presente pesquisa é possível concluir que a espécie *D.subspicatus* apresentou taxas de crescimento bastante elevadas e superiores as taxas encontradas.

Nas Figuras 18 e 19 foram avaliados os cultivos de *D.subspicatus*, com os inocúlos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% utilizando o metabolismo heterotrófico, em efluente com e sem filtração, respectivamente. As densidades celulares foram bem inferiores quando comparadas ao cultivo autotrófico. Na Figura 19, utilizando o efluente com filtração, a DCM_{ax} para o cultivo com 5% foi de $6,5 \times 10^5$ cel/mL no 9º dia de cultivo. No cultivo a 10%, a DCM_{ax} foi no 8º dia de cultivo, com apenas $6,25 \times 10^5$ cel/mL e no cultivo a 20%, o maior valor foi no 15º dia, apresentando apenas $1,75 \times 10^6$ cel/mL e as curvas de crescimento não apresentaram fase exponencial. Com inóculo inicial de 30%, maior densidade ocorreu no 2º dia com apenas $3,38 \times 10^6$ cel/mL e no cultivo com 40% de inóculo inicial, a DCM_{ax} também foi verificada o 2º dia de cultivo $3,93 \times 10^6$ cel/mL. Com inóculo inicial de 50%, a DCM_{ax} foi de apenas $4,98 \times 10^6$ cel/mL, no 15º dia de cultivo. No efluente sem filtração, a densidade celular máxima foi no 6º dia de cultivo, $4,75 \times 10^6$ cel/mL, no cultivo com 50% os outros percentuais também apresentaram densidade baixas quando comparadas ao cultivo autotrófico.

Figura 18 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo heterotrófico, em efluente com filtração.

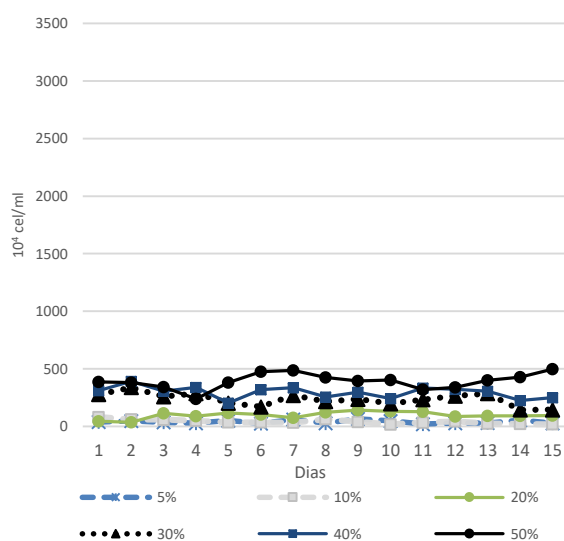
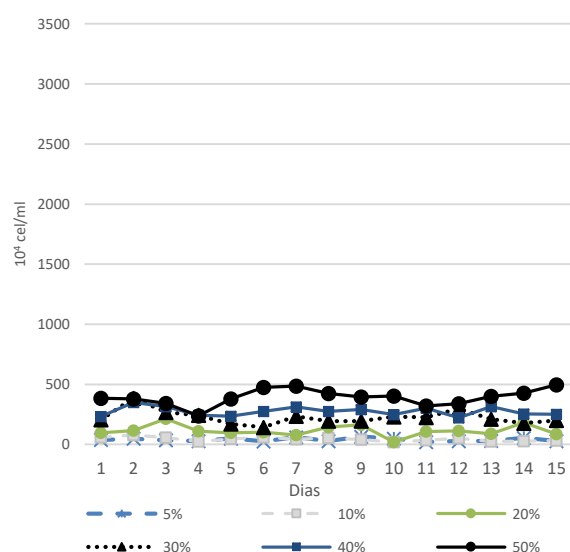


Figura 19 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo heterotrófico, em efluente sem filtração.



Provavelmente, esse fraco desempenho possa ser explicado pela falta de uma fonte de carbono orgânico, que não foi suprida pelas fontes presentes no efluente doméstico pós-DS. Contudo, ainda não se pode descartar o cultivo heterotrófico apenas com esse resultado, já que outros tipos de efluentes e concentrações serão utilizados para que uma avaliação mais completa possa ser desenvolvida.

As análises estatísticas de Kruskal-Wallis ($\alpha = 5\%$) e teste de Dunn para o cultivo com metabolismo heterotrófico, demonstram que não houve diferença significativa na comparação entre o efluente com e sem filtração, como também na comparação entre os inóculos iniciais.

Liang, Sarkany e Cui (2009), apontaram que as principais fontes de carbono e energia para o crescimento heterotrófico das microalgas são carboidratos e ácidos orgânicos, destacando-se a glicose, o acetato (ácido acético) e o glicerol, bem como o amido de mandioca e águas residuárias. As taxas de respiração e crescimento tendem a ser melhores com glicose do que com qualquer outra fonte de carbono. Isto ocorre porque a glicose libera mais energia por mol do que outras fontes. Contudo, a fonte de carbono é um dos itens que mais encarecem os cultivos heterotróficos. Segundo, Li, Xu e Wu (2007) a glicose corresponda a cerca de 45% do custo total da produção heterotrófica. Embora a glicose sustente as melhores produções de biomassa, é essencial pesquisar alternativas a esta fonte. Desta forma, as pesquisas com efluentes domésticos e industriais são importantes para avaliar o comportamento das espécies cultivadas.

De acordo com Liang et al. (2010) a utilização de efluentes para a produção de microalgas com metabolismo heterotrófico tem alguns desafios a serem vencidos, tais como; presença de compostos tóxicos e de microrganismos e a variabilidade da composição dos efluentes. Uma alternativa para solucionar parte dessas questões é o isolamento de cepas de microalgas dos próprios efluentes, que tendem a ser mais robustas e competitivas.

Outra alternativa para aplicação do cultivo heterotrófico seria o tratamento de esgoto doméstico utilizando um sistema sequencial de microalgas. Na primeira etapa, as microalgas cresceriam heterotroficamente, com o objetivo de diminuir o potencial poluidor do esgoto e também produzir biomassa para produção de biodiesel. Após esta etapa, a biomassa poderia ser separada e utilizada como meio de cultivo para a etapa autotrófica (ZHOU et al., 2013). Este tipo de aplicação do cultivo heterotrófico pode ser avaliado em estudos posteriores.

Assim como outros microrganismos heterotróficos, o meio de cultivo para as microalgas heterotróficas deve apresentar a fonte de carbono, mas também outros compostos, destacando-

se as fontes de nitrogênio e fósforo. Portanto, é necessário considerar a necessidade nutricional como um todo da cepa e não apenas de sua fonte de carbono (MUTHURAJ et al., 2014; PALABHANVI et al., 2014). No presente estudo, o experimento com metabolismo heterotrófico não foi adicionada nenhuma fonte de carbono, já que se esperava que os compostos carbonáceos e os nutrientes presentes no esgotopudessem suprir as demandas para o crescimento da espécie de microalga que foi utilizada no cultivo

Na Tabela 6 estão apresentadas as taxas de crescimento dos inóculos iniciais nos cultivos com metabolismos heterotróficos. As taxas de crescimento foram bem inferiores quando comparadas aos do cultivo autotrófico.

Tabela 6 - Taxa de crescimento de *D subspicatus* nos cultivos heterotróficos com inóculos iniciais 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.

Experimentos	Taxa de crescimento
Heterotrófico	
5% com filtração	0,338 dia ⁻¹
5% sem filtração	0,413 dia ⁻¹
10% com filtração	0,4951 dia ⁻¹
10% sem filtração	0,5863 dia ⁻¹
20% com filtração	0,5676 dia ⁻¹
20% sem filtração	0,4018 dia ⁻¹
30% com filtração	0,462 dia ⁻¹
30% sem filtração	0,630 dia ⁻¹
40% com filtração	0,453 dia ⁻¹
40% sem filtração	0,403 dia ⁻¹
50% com filtração	0,293 dia ⁻¹
50% sem filtração	0,329 dia ⁻¹

Fonte: A Autora, 2015.

Na Figura 20 estão demonstrados os resultados das curvas de crescimento *D. subspicatus*, com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% utilizando o metabolismo mixotrófico, em efluente com filtração. As maiores DCM_{ax} também ocorreram nos cultivos de 5% e 50%, apresentando densidades de $2,89 \times 10^7$ cel/mL e $3,00 \times 10^7$ cel/mL, respectivamente e houve a redução acentuada no número de células, logo após o pico, que provavelmente estava relacionada presença de organismos predadores e redução na concentração dos nutrientes. No cultivo com 10% de inóculo inicial ocorreu no dia 11º a DCM

$_{ax}$ com $1,59 \times 10^7$ cel/mL, após este dia, ocorreu a fase de declínio da curva. No inóculo inicial de 20%, a maior densidade celular ocorreu no 10º dia de cultivo com $1,61 \times 10^7$ cel/mL. No cultivo com 30% de inóculo inicial, a DCM_{ax} foi atingida no 6º dia de cultivo ($1,76 \times 10^7$ cel/mL) e após este dia, foi iniciada a fase de declínio da curva. No cultivo com 40% de inóculo inicial, ocorreu no 8º dia de cultivo a DCM_{ax} ($1,63 \times 10^7$ cel/mL).

Figura 20 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo mixotrófico, em efluente com filtração.

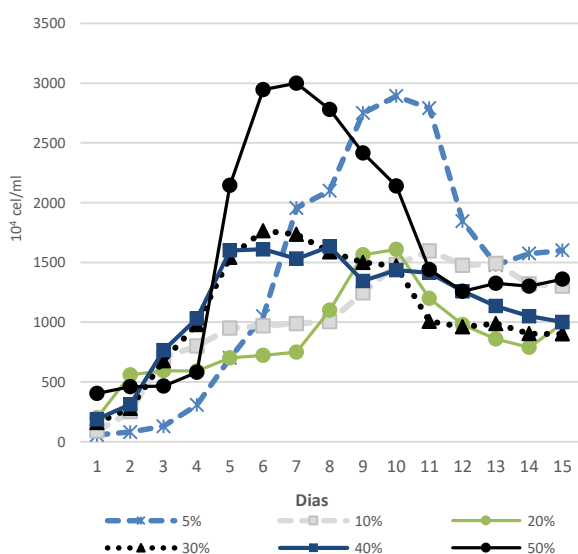
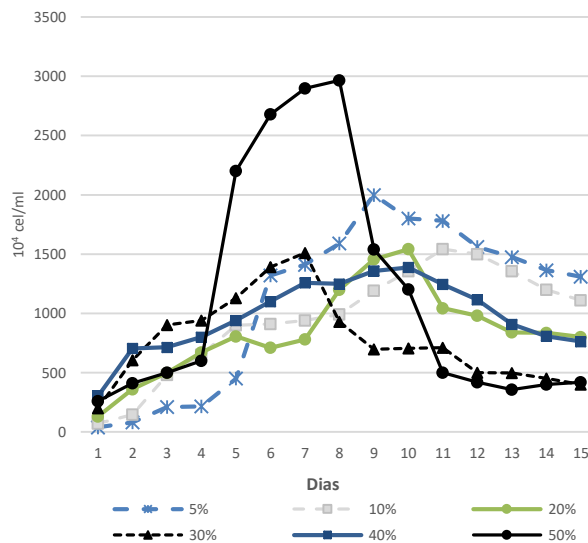


Figura 21 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com metabolismo mixotrófico, em efluente sem filtração.



Na Figura 21 estão apresentados os resultados de densidade celular dos cultivos com metabolismo mixotrófico, com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e com efluente sem filtração. A maior DCM_{ax} foi no cultivo com 50% de inóculo inicial; No 5%, a maior densidade ocorreu no 9º dia com $2,00 \times 10^7$ cel/mL e depois houve uma redução discreta da densidade. A DCM_{ax} do cultivo com 50% de inóculo inicial, ocorreu no 8º dia de cultivo ($2,96 \times 10^7$ cel/mL) e depois houve um decréscimo acentuado da densidade celular. No cultivo com 20% de inóculo inicial, ocorreu uma diminuição da densidade de microalgas após o 10º dia, quando a densidade celular atingiu $1,54 \times 10^7$ cel/mL, enquanto no cultivo com 10% de densidade a fase de declínio foi iniciada após o 12º dia e a DCM_{ax} foi também de $1,54 \times 10^7$ cel/mL. Também foi verificada a presença de microrganismos predadores nos cultivos. No inóculo de 30%, a maior densidade ocorreu no 7º dia ($1,51 \times 10^7$ cel/mL), seguindo uma fase de declínio e no cultivo com 40% de inóculo inicial, a DCM_{ax} ocorreu no 10º dia de cultivo ($1,38 \times 10^7$ cel/mL) e também houve a redução da densidade nos dias posteriores.

Os testes estatísticos de Kruskal-Wallis e Dun também foram aplicados para avaliar o metabolismo mixotrófico e se existiam diferenças entre os inóculos iniciais dos cultivos e para a variável filtração do efluente. Os resultados dos testes estatísticos revelaram que também não houve diferenças significativas comparando os inóculos iniciais, nem para a variável filtração do efluente.

Girard et al. (2014) estudaram o cultivo mixotrófico de *Scenedesmus obliquus* em cultivo com permeado do soro do queijo que apresentou DCM_{ax} entre $2,5$ e $3,0 \times 10^6$ cel/mL, e o autor concluiu que *S. obliquus* teve capacidade de crescer utilizando lactose. Os valores de DCM_{ax} de *D. subspicatus* foram inferiores aos do trabalho citado, sendo importante futuros trabalhos com a utilização de outros meios de cultivo.

Diante dos resultados é possível concluir que o cultivo autotrófico apresentou um melhor desenvolvimento da densidade celular (maior DCM_{ax}), quando comparado ao cultivo heterotrófico, entretanto, a curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* a partir do metabolismo mixotrófico foi semelhante à do cultivo autotrófico e não houve diferença estatística entre os resultados, gerando assim, uma possibilidade de redução de custos com a energia elétrica, por exemplo, no caso de utilização de energia luminosa artificial para o cultivo. Também pode-se optar por realizar o cultivo mixotrófico com iluminação natural, já que nos experimentos foi utilizado o intervalo de 12h com luz e 12h sem luz, algo semelhante ao que acontece na natureza.

Heredia-Arroyo, Wei e Hu (2010), avaliaram os resultados de crescimento da espécie *Chlorella vulgaris* com metabolismos autotróficos, mixotróficos e heterotróficos; e o cultivo mixotrófico, produziu mais biomassa que as culturas autotróficas ou heterotróficas. Os resultados de densidade celular no cultivo mixotrófico demonstraram que os efeitos estimulantes do crescimento com utilização de apenas luz e CO_2 foram tão fortes como os efeitos da utilização de glicose. O resultado encontrado na presente pesquisa corroborou com os resultados da pesquisa citada, quanto à aplicabilidade do cultivo mixotrófico, sem necessidade de adição de glicose.

Foram avaliadas também as taxas de crescimento dos cultivos mixotróficos, conforme resultados apresentados na Tabela 7. A maior taxa de crescimento foi no cultivo com 30% de inóculo inicial com efluente sem filtração ($1,197 \text{ dia}^{-1}$).

Tabela 7 - Taxa de crescimento de *D subspicatus* no cultivo mixotrófico com inóculos iniciais a 5% 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-DS com filtração e sem filtração.

Experimentos	Taxa de crescimento
Mixotrófico	
5% com filtração	0,824 dia ⁻¹
5% sem filtração	0,907 dia ⁻¹
10% com filtração	1,107 dia ⁻¹
10% sem filtração	1,021 dia ⁻¹
20% com filtração	1,018 dia ⁻¹
20% sem filtração	1,029 dia ⁻¹
30% com filtração	0,721 dia ⁻¹
30% sem filtração	1,110 dia ⁻¹
40% com filtração	0,896 dia ⁻¹
40% sem filtração	0,841 dia ⁻¹
50% com filtração	0,417 dia ⁻¹
50% sem filtração	0,748 dia ⁻¹

Fonte: A Autora, 2015.

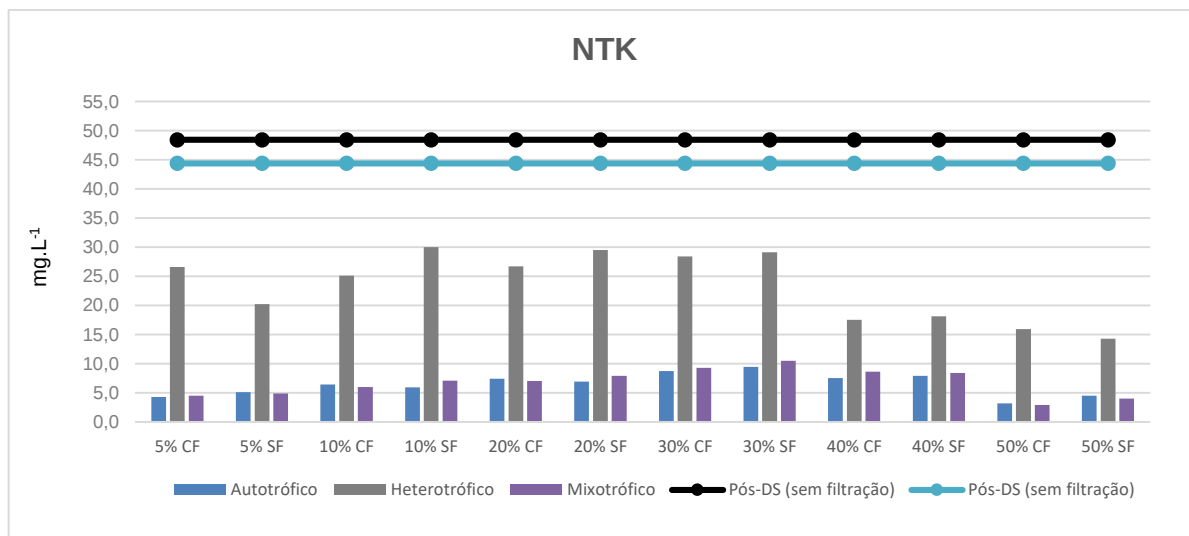
Wang et al. (2010), estudaram o cultivo de *Chlorella sp.* com metabolismo mixotrófico e em diferentes águas residuárias de estações de tratamento de esgoto doméstico. As taxas de crescimento médias no período foram de: 0,412, 0,429, 0,343 e 0,948 dia⁻¹, considerando os cultivos com os seguintes efluentes: antes do tratamento primário, após o tratamento primário, após o lodo ativado e efluente proveniente da desidratação de lodo em centrífuga. Comparando os resultados de taxa de crescimento do presente trabalho, principalmente dos cultivos com inóculo inicial de 10%, 20% e 30%, as taxas de crescimento foram superiores ao maior valor encontrado no estudo supracitado.

5.1.2 Avaliação da remoção de nutrientes e matéria orgânica residual do efluente após o cultivo de *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%

Após o experimento de cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico com inóculos iniciais de 5% 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-DS com filtração (CF) e sem filtração (SF), foram realizadas as análises físico-químicas para avaliar as eficiências de remoção de nutrientes e matéria orgânica residual.

Na Figura 22 estão as concentrações de NTK após o cultivo de microalgas com efluente pós-decantador secundário considerando os seis inóculos iniciais aplicados e os três metabolismos.

Figura 22- Concentrações de NTK após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, considerando os cultivos com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



É possível concluir que houve uma expressiva redução na concentração de NTK dos efluentes com e sem filtração, principalmente nos metabolismos autotróficos e mixotrófico. Na Tabela 9 estão apresentadas as eficiências de remoção de NTK e os maiores percentuais foram observados no cultivo autotrófico quando comparados aos demais metabolismos. Utilizando efluente com e sem filtração foram verificados no cultivo com 5% e 50% de inóculos iniciais, 90,70% e 93,08% para o com filtração e 89,76% e 90,70%, respectivamente. O cultivo mixotrófico apresentou a maior eficiência de remoção de NTK no cultivo com 50% de inóculo inicial e efluente sem filtração (70,45%). Os cultivos com 5% e 50% foram os que apresentaram maior densidade celular e isto pode ter proporcionado um maior consumo deste nutriente.

Tabela 8– Eficiência média de remoção de NTK nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.

Eficiência de remoção de NTK			
Autotrófico			
5% CF	90,70%	5% SF	89,46%
10% CF	86,16%	10% SF	87,81%
20% CF	84,00%	20% SF	85,74%
30% CF	81,17%	30% SF	80,52%
40% CF	83,74%	40% SF	83,64%
50% CF	93,08%	50% SF	90,70%
Heterotrófico			
5% CF	42,49%	5% SF	58,26%
10% CF	45,73%	10% SF	38,02%
20% CF	42,27%	20% SF	39,05%
30% CF	38,59%	30% SF	39,88%
40% CF	62,16%	40% SF	62,60%
50% CF	65,62%	50% SF	70,45%
Mixotrófico			
5% CF	42,49%	5% SF	58,26%
10% CF	45,73%	10% SF	38,02%
20% CF	42,27%	20% SF	39,05%
30% CF	38,59%	30% SF	39,88%
40% CF	62,16%	40% SF	62,60%
50% CF	62,65%	50% SF	70,45%

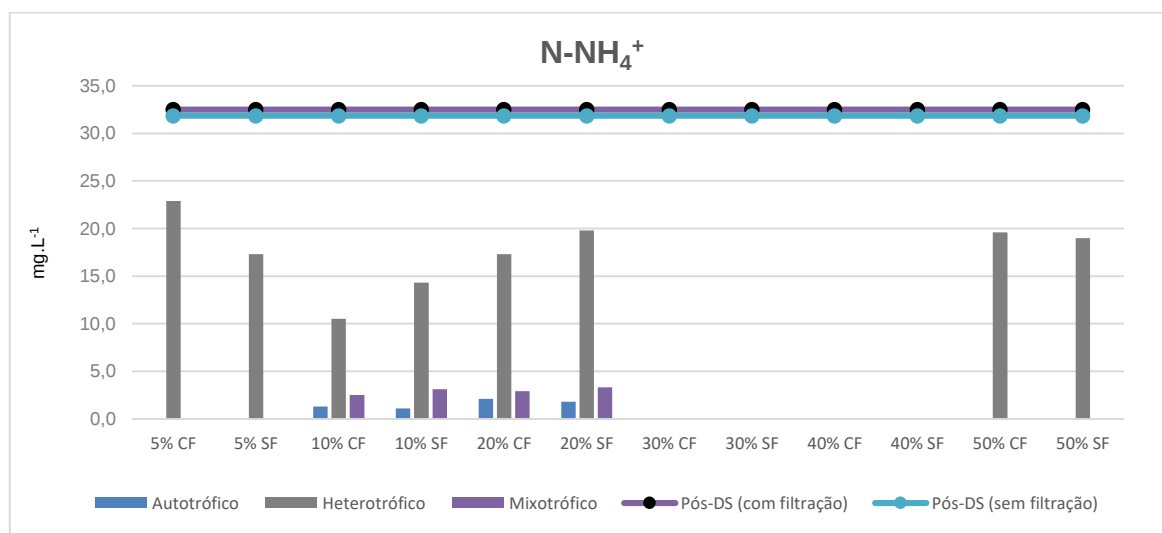
Fonte: A Autora, 2015.

Na Figura 23 estão apresentadas as concentrações de N-NH_4^+ após o cultivo de microalgas com efluente pós-decantador secundário com e sem filtração. Nos cultivos com 5%, 30%, 40%, 50% de inóculos iniciais, metabolismos autotrófico e mixotrófico houve remoção total N-NH_4^+ (100% de eficiência). No cultivo heterotrófico também houve o consumo total de N-NH_4^+ do cultivo (inóculos iniciais de 30% e 40%).

A média de pH do cultivo autotrófico com filtração e com 50% de inóculo inicial foi de 9,3 e de 5% foi de 9,6, já no cultivo sem filtração foram de 9,7 e 8,9, respectivamente. Estes valores elevados de pH podem ser benéficos para redução de alguns organismos patogênicos do efluente, como também pode auxiliar nos processos de volatilização da amônia. De acordo

com Talbot e de la Noie (1993), nos cultivos de microalgas com águas residuárias, além da remoção devido à absorção de algas, também há o efeito da remoção de NH_3 devido à alcalinização do meio e que também podem contribuir para a redução do nitrogênio.

Figura 23 - Concentração de N-NH_4^+ após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, considerando os cultivos com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



De acordo com Perez-Garcia (2011), a amônia é a fonte de nitrogênio preferida das microalgas, e também a fonte energeticamente mais eficiente, já que menos energia é necessária para sua absorção. Segundo o autor, condições de crescimento heterotrófico não afetam as taxas de absorção de amônia e a expressão das enzimas de assimilação de nitrogênio, e tanto sob condições autotróficas ou heterotróficas, a amônia é transportada através das membranas por um grupo de proteínas pertencentes à família transportadoras de amônia (WILHELM et al., 2006). Sendo assim, mesmo sob condições heterotróficas e menor densidade celular, o cultivo heterotrófico foi eficiente no consumo de N-NH_4^+ . Os resultados de pH obtidos no cultivo heterotrófico também podem influenciar na eficiência de remoção de nitrogênio. No cultivo com filtração a média foi de 8,4 e 8,3 nos cultivos com 30% e 40% com inóculos iniciais, respectivamente e os cultivos sem filtração, o pH médio foi de 8,4 no cultivo com 30% e 8,30 no cultivo com 40%. Na Tabela 9 estão apresentadas as eficiências médias de remoção de N-NH_4^+ .

Tabela 9– Eficiência média de remoção de N-NH_4^+ nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.

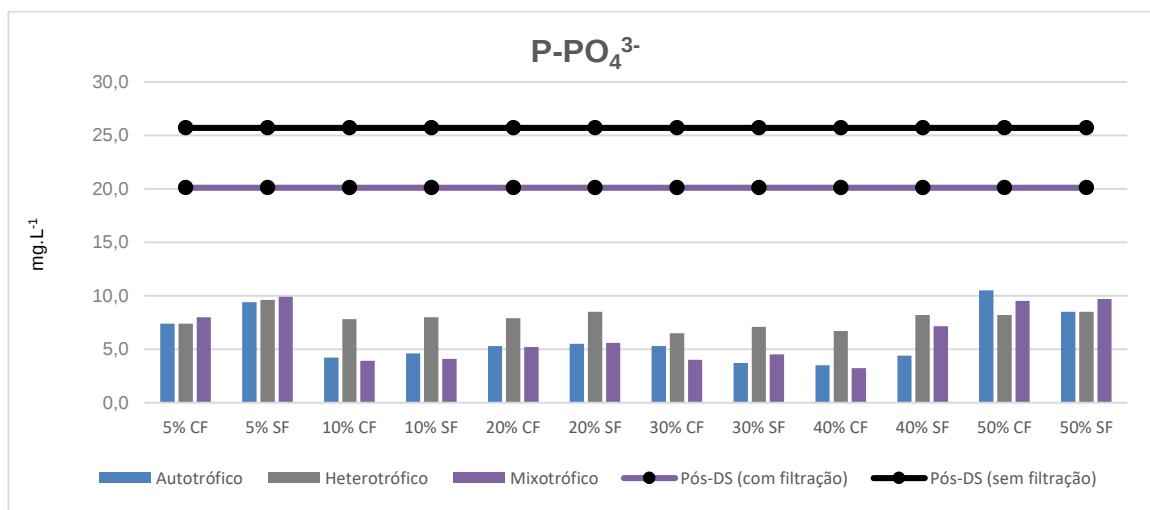
Eficiência de remoção de N-NH_4^+			
Autotrófico			
5% CF	100,00%	5% SF	100,00%
10% CF	96,00%	10% SF	96,98%
20% CF	93,54%	20% SF	95,05%
30% CF	100,00%	30% SF	100,00%
40% CF	100,00%	40% SF	100,00%
50% CF	100,00%	50% SF	100,00%
Heterotrófico			
5% CF	29,54%	5% SF	52,47%
10% CF	67,69%	10% SF	60,71%
20% CF	46,77%	20% SF	45,60%
30% CF	100,00%	30% SF	100,00%
40% CF	100,00%	40% SF	100,00%
50% CF	39,69%	50% SF	47,80%
Mixotrófico			
5% CF	100,00%	5% SF	100,00%
10% CF	93,31%	10% SF	91,48%
20% CF	91,08%	20% SF	90,93%
30% CF	100,00%	30% SF	100,00%
40% CF	100,00%	40% SF	100,00%
50% CF	100,00%	50% SF	100,00%

Fonte: A Autora, 2015.

Normalmente, para remoção de nitrogênio, existem unidades de tratamento em ETE's cujo objetivo é a realização de nitrificação e desnitrificação biológica para transformação de amônia (NH_4^+) em nitrato (NO_3^-) e no final do processo, gerar nitrogênio atmosférico (N_2). Embora eficaz para remoção de N total, a nitrificação e desnitrificação são processos caros e complexos que transfere o nitrogênio para a atmosfera, onde não é mais útil como nutriente. Em sistema de cultivo de algas com águas residuárias, o nitrogênio é assimilado pelas células e posteriormente pode ser reciclado, através da utilização da biomassa das algas (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIDAN; IBRAHEEM, 2012).

Na Figura 24 estão apresentadas as concentrações de fósforo total após o cultivo de microalgas com efluente pós-decantador secundário com e sem filtração. Também houve uma redução considerável a concentração após o cultivo.

Figura 24– Concentração média de fósforo total após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração, com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



No processo de tratamento terciário ocorre a remoção dos íons orgânicos, que pode ser realizada biologicamente através do cultivo de espécies de microalgas que se adaptam a altas concentrações de nutrientes. O tratamento terciário biológico pode ter um bom desempenho em comparação a processos químicos, que são em geral onerosos para serem implementados e que pode levar à poluição secundária. Os cultivos de microalgas oferecem uma solução para os tratamentos terciários devido a capacidade das microalgas em usar nitrogênio inorgânico e fósforo para o seu crescimento e também, pode ser explorada a sua capacidade de remover metais pesados (RAI; GOUR; KUMAR, 1981), bem como alguns compostos orgânicos tóxicos (REDALJE et al., 1989). Dentre outras características benéficas das microalgas, principalmente no metabolismo autotrófico, são que elas também têm a capacidade de produzir oxigênio para o meio através da fotossíntese e o efeito de desinfecção devido ao aumento do pH durante a fotossíntese (MARA; PEARSON, 1986; DE LA NOUÈ; DE PAUW, 1988). Sendo assim, na produção biodiesel a partir de *D. subspicatus*, podem ser explorados estes outros benefícios citados para haja viabilidade no processo.

Na Tabela 10 estão apresentados os resultados de eficiência de remoção de $P-PO_4^{3-}$. O metabolismo autotrófico apresentou altas eficiências de remoção, principalmente nos cultivos com filtração com 10% e 40% de inóculos iniciais. Deve-se considerar também que a média de

pH do cultivo durante o experimento com 10% de inóculo inicial foi de 9,8 desta forma, o processo de remoção de fósforo pode ser sido por precipitação também em decorrência do pH elevado.

A remoção convencional de fósforo total baseia-se na precipitação de fosfato inorgânico por sais de ferro ou alumínio. Apesar da precipitação ser eficaz para a remoção de P, este método de tratamento elimina a perspectiva de reciclar o fósforo, pois os fosfatos de ferro ou alumínio não estão disponíveis para absorção metabólica e altas concentrações desses sais são tóxicas. Outros mecanismos para recuperar P incluem adsorção, troca iônica e absorção biológica. Sendo assim, a remoção de fósforo por sistemas compostos por microalgas pode ser uma alternativa para reciclagem de fósforo através da absorção biológica (ABDEL-RAOUF; AL-HOMAIAN; IBRAHEEM, 2012).

Tabela 10 - Eficiência de remoção de $P-PO_4^{3-}$ nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.

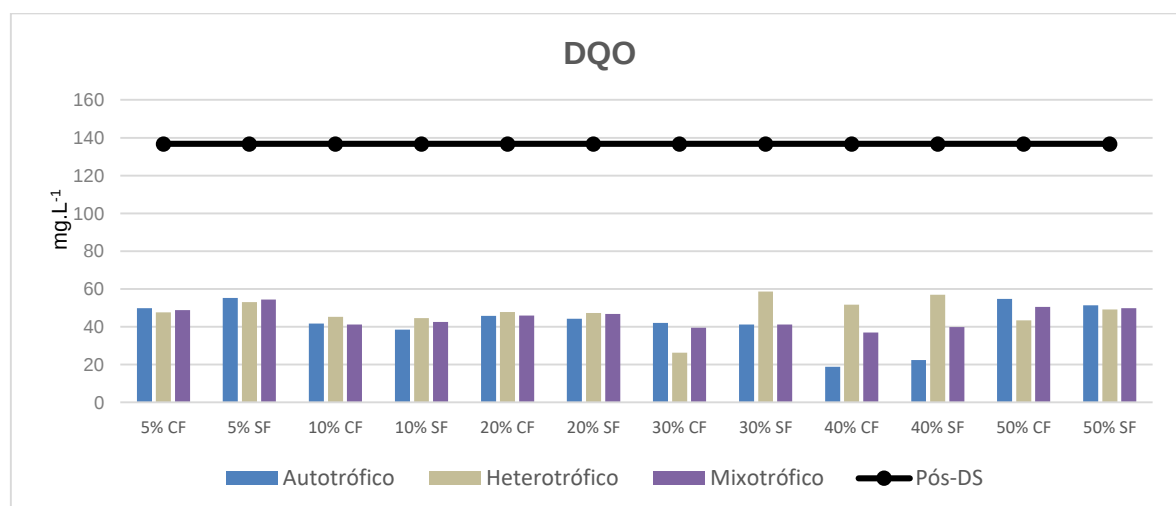
Eficiência de remoção de $P-PO_4^{3-}$			
Autotrófico			
5% CF	71,21%	5% SF	53,23%
10% CF	83,66%	10% SF	77,11%
20% CF	79,38%	20% SF	72,64%
30% CF	79,38%	30% SF	81,59%
40% CF	86,38%	40% SF	78,11%
50% CF	59,14%	50% SF	66,93%
Heterotrófico			
5% CF	71,21%	5% SF	52,24%
10% CF	69,65%	10% SF	60,20%
20% CF	69,26%	20% SF	57,71%
30% CF	74,71%	30% SF	64,68%
40% CF	73,93%	40% SF	59,20%
50% CF	68,09%	50% SF	57,71%
Mixotrófico			
5% CF	68,87%	5% SF	50,75%
10% CF	84,82%	10% SF	79,60%
20% CF	79,77%	20% SF	72,14%
30% CF	84,40%	30% SF	82,41%
40% CF	87,51%	40% SF	64,43%
50% CF	63,04%	50% SF	51,74%

Fonte: A Autora, 2015.

Segundo Talbot e de la Noíie (1993), espera-se que quanto maior a densidade de algas no inóculo inicial utilizado para o cultivo, melhor o crescimento e consequentemente maior a eficiência de remoção de nutrientes. No entanto, a alta densidade de microalgas pode ocasionar auto-sombreamento, uma acumulação de auto-inibidores e uma redução na eficiência da capacidade fotossintética (FOGG, 1975; DARLEY, 1982). Em relação os inóculos iniciais de microalgas aplicadas neste experimento, os resultados estatísticos mostraram que não houve diferença significativa do crescimento celular e quando avaliada a remoção de fósforo total, por exemplo, o cultivo que apresentou menor densidade celular média ao longo do cultivo (10% de inóculo inicial), foi o que obteve maiores percentuais de remoção do nutriente, quando comparado os outros percentuais.

Na Figura 25 estão apresentadas as concentrações de DQO após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração. De acordo com Ji et al. (2014), a produção de biomassa de microalgas depende da rápida utilização do conteúdo orgânico do efluente e pode ser considerado como um meio promissor, eficiente e ecológico para o tratamento de águas residuárias, tanto domésticas quanto industriais, pois, além de remover a carga orgânica, o cultivo de microalgas, agrega valor ao processo, gerando produtos com valor comercial, exemplo da biomassa de algas e o óleo. Existem ainda alguns gargalos, que limitam a produção em grande escala, no entanto, o uso duplo do cultivo de microalgas para o tratamento de águas residuárias e produção de compostos de valor agregado é uma opção atraente em termos de redução do custo da energia e dos custos com recursos (nutrientes e água doce).

Figura 25— Concentração média de DQO após o cultivo pós-decantador secundário com e sem filtração e com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



Segue abaixo a Tabela 11 que apresenta as eficiências de remoção de DQO. Os resultados demonstraram elevados percentuais de redução de DQO e que foram semelhantes para os três metabolismos utilizados.

Tabela 11 - Eficiência média de remoção de DQO nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, cultivos com metabolismos, autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS com e sem filtração.

Eficiência de remoção de DQO			
Autotrófico			
5% CF	61,41%	5% SF	59,62%
10% CF	67,75%	10% SF	71,84%
20% CF	64,58%	20% SF	67,59%
30% CF	67,44%	30% SF	69,86%
40% CF	85,38%	40% SF	83,61%
50% CF	57,70%	50% SF	62,47%
Heterotrófico			
5% CF	63,11%	5% SF	61,23%
10% CF	64,97%	10% SF	67,37%
20% CF	62,95%	20% SF	65,40%
30% CF	79,66%	30% SF	57,06%
40% CF	60,02%	40% SF	58,38%
50% CF	66,43%	50% SF	64,08%
Mixotrófico			
5% CF	62,18%	5% SF	60,13%
10% CF	68,14%	10% SF	68,84%
20% CF	64,50%	20% SF	65,76%
30% CF	69,37%	30% SF	69,86%
40% CF	71,46%	40% SF	70,89%
50% CF	60,87%	50% SF	63,57%

Fonte: A Autora, 2015.

Os resultados deste experimento também demonstraram que o cultivo da espécie *D. subspicatus* em esgoto doméstico pode ser viável para tratamento de efluentes, principalmente em estações de tratamento de efluentes de nível secundário, para complementação do tratamento a nível terciário.

Diante dos resultados de eficiências de remoção elevados que foram apresentados pela espécie *D. subspicatus*, esta microalga pode ser considerada para utilização em estações

tratamento de águas residuárias, principalmente devido à sua capacidade de assimilação de N e P, antes da descarga para o meio ambiente, em conjunto com a produção de biocombustíveis. O pós-tratamento de efluente com uso de algas, poderia ser realizado em fotobioreatores ou em lagoas de rolamento (raceway paddle ponds) e o esgoto seria a fonte de nutrientes e água para estes microrganismos produzirem lipídios para uso na fabricação de biocombustíveis (UNNITHAN; UNC; SMITH, 2014).

5.1.3 Percentual de óleo do cultivo de *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluentes pós-DS com e sem filtração.

Na Tabela 12 estão apresentados os resultados percentual de óleo dos cultivos de *D. subspicatus* com metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico que foram analisados após o término do experimento. Os resultados demonstraram que o cultivo mixotrófico apresentou valores mais elevados de produção em comparação com os outros metabolismos e os percentuais foram maiores nos cultivos com 40% de inóculo inicial. De maneira geral, os cultivos com efluente sem filtração apresentaram maiores percentuais de acúmulo, quando comparados aos cultivos onde foram utilizados efluentes com filtração. Os resultados do percentual de óleo não estiveram relacionados com a densidade celular, que se apresentaram mais elevadas para o cultivo com 5% e 50% de inóculos iniciais.

Tabela 12 - Percentual de óleo de *D. subspicatus* inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico e efluente pós-DS.

Percentual de óleo (%)			
	Autotrófico	Heterotrófico	Mixotrófico
5% com filtração	17%	9%	21%
5% sem filtração	18%	10%	23%
10% com filtração	17%	6%	21%
10% sem filtração	19%	7%	23%
20% com filtração	23%	9%	27%
20% sem filtração	25%	9%	31%
30% com filtração	17%	10%	23%
30% sem filtração	19%	9%	25%
40% com filtração	23%	11%	31%
40% sem filtração	26%	12%	33%
50% com filtração	23%	12%	27%
50% sem filtração	25%	13%	28%

Fonte: A Autora, 2015.

Correlacionado os resultados de percentual de óleo com o comportamento da curva de crescimento dos experimentos, é possível inferir que os valores mais baixos de óleo do cultivo autotrófico comparados com os do cultivo mixotrófico, podem estar relacionados com a redução drástica da densidade celular ao longo do cultivo em decorrência da ação da herbivoria, neste cultivo. No cultivo heterotrófico, o conteúdo lipídico foi inferior ao dos outros metabolismos, o que também pode estar relacionado com a falta do carbono orgânico para o metabolismo celular.

Zhao et al. (2012) avaliaram o rendimento lipídico de *Scenedesmus quadricauda* utilizando diferentes fontes de carbono e os resultados demonstraram que foi muito menor no cultivo contendo NaHCO_3 como única fonte de carbono, enquanto a concentração de CO_2 e glicose influenciava a produção e acúmulo de lipídios em culturas autotrófica e heterotrófica. Além disso, o conteúdo lipídico de *S. quadricauda* em cultura mixotrófica (33,1%) foi muito superior que no cultivo autotrófico e heterotrófico (14-28%). Em comparação com os percentuais de óleo apresentados pelo presente trabalho, é possível concluir que o cultivo com *D. subspicatus* e com metabolismo mixotrófico, sem adição de outras fontes de carbono, utilizando apenas as que estavam presentes no efluente, foram bastante promissores, pois o resultado de percentual de óleo de 31% do cultivo mixotrófico foi semelhante ao encontrado no estudo citado, onde houve a introdução de glicose e CO_2 .

Segundo Halim e Webley (2012), o conteúdo e o perfil lipídico também são afetados pelo estágio do ciclo de vida. O aumento da biomassa na fase de crescimento é seguido pela fase estacionária, momento em que o estresse causado pela privação de fatores de crescimento, como nutrientes, por exemplo, aumenta a síntese e o acúmulo de lipídios. A coleta da biomassa de algas para execução das análises de lipídios do presente estudo foi realizada no 15º dia, quando os cultivos autotróficos e mixotróficos já apresentavam redução na densidade celular, possivelmente relacionada ao estresse nutricional, que pode ter sido uma influência positiva para se atingir maiores percentuais de óleo por grama de biomassa.

De acordo com Beevi e Sukumaran (2014), a maioria dos estudos de cultivo heterotrófico com uso de águas residuárias, tem como foco principal o tratamento do efluente, sendo a biomassa gerada um subproduto do processo. Os cultivos utilizando águas residuárias não produzem tanto quanto o meio à base de glicose, estes meios de cultivo podem ser promissores, principalmente, para a produção de compostos de baixo valor agregado, como o

biodiesel. Além disso, como ocorre redução do potencial de poluição dos efluentes utilizados, agrega-se valor ambiental ao processo. Sendo assim, apesar da menor densidade celular apresentada pelos cultivos heterotróficos, quando comparada aos outros metabolismos testados, pode-se explorar a associação entre produção de biodiesel e remoção de nutrientes e matéria orgânica do esgoto utilizado no cultivo, como também a reciclagem dos nutrientes, com a utilização da biomassa gerada

Liang, Sarkany e Cui (2009), concluíram que no cultivo mixotrófico não se observa fotoinibição, fenômeno comum em sistemas autotróficos com altas intensidades luminosas. A fotoinibição relaciona-se à saturação do fotossistema II e pode causar danos irreparáveis nas células das microalgas. A alta produtividade do cultivo mixotrófico também pode estar relacionada, como outros fatores como, por exemplo: (1) diminuição dos danos causados por excesso de oxigênio no meio de cultivo; (3) altas taxas metabólicas, com entrada de energia tanto por meio da oxidação da fonte orgânica de carbono quanto da luz; (4) consumo conjunto de dióxido de carbono e substrato orgânico como fontes de carbono.

De acordo com Markou e Georgakakis (2011), as cepas de microalgas em cultivo mixotrófico requerem menor intensidade luminosa para o seu crescimento. Desta maneira, caso seja utilizada iluminação artificial, os gastos com este parâmetro serão menores no sistema mixotrófico, quando comparado com o autotrófico.

Segundo Li et al. (2012), a escassez nutricional promove mudanças metabólicas, nas quais, diminuem a formação de compostos protéicos e clorofilados das células, e consequentemente sua taxa de multiplicação, afetando o crescimento e a produtividade. Por outro lado, há um acréscimo na produção de substâncias de reserva no interior da célula, tais como carboidratos ou lipídios, que os organismos se utilizam em casos de escassez prolongada de nutrientes no meio, garantindo assim, a sua sobrevivência e manutenção celular. Sendo assim, a remoção total de nitrogênio amoniacal que foi observada principalmente nos cultivos autotrófico e mixotrófico deste experimento, pode ter sido um fator positivo para o acúmulo de lipídios, neste experimento.

5.2 ETAPA 2 – AVALIAÇÃO DOS CRESCIMENTOS DE *DESMODESMUS SUBSPICATUS* EM EFLUENTE PÓS-FAS COM E SEM AUTOCLAVAGEM

Para realização da etapa 2 do experimento foi utilizada a espécie *Desdesmuus subspicatus* com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% utilizando o efluente pós- filtro biológico aerado submerso.

5.2.1 Crescimento de *D. subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-FAS com e sem autoclavagem

Foi realizada a caracterização do efluente do ponto de coleta pós-FAS, que foi utilizado como meio de cultivo. Segue abaixo a Tabela 14 com resultados das medições de: pH, oxigênio dissolvido(mg.L⁻¹), temperatura(°C) e condutividade(μS/cm).

Tabela 13 - Resultados de medições do efluente pós-FAS na ETE Centro

Efluente	pH	Temperatura(°C)	OD (mg.L ⁻¹)	Condutividade(μS/cm)
Pós-FAS	7,4	30,4	2,1	1.650

Fonte: A Autora, 2016.

Os resultados das análises de DQO (mg.L⁻¹), NTK (mg.L⁻¹), N- amoniacal (mg.L⁻¹) e fósforo total(mg.L⁻¹) estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-FAS na ETE Centro.

Efluente	DQO mg.L ⁻¹	NTK mg.L ⁻¹	N-amoniaca mg.L ⁻¹	Fósforo total mg.L ⁻¹
Pós-FAS	53,89±8,45	60,45±9,12	56,56±5,23	55,06±11,21

Fonte: A Autora, 2015.

Os experimentos foram realizados com duração de 15 dias, utilizando a espécie *D. subspicatus* onde foram avaliados os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, como também o efluente autoclavado e não autoclavado e as os inóculos iniciais da microalga a 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em relação ao volume total do reator.

Na Figura 28 estão os resultados de densidade celular do cultivo autotrófico com efluente autoclavado. A maior DCM_{ax} foi de 2,57 x 10⁷ cel/mL no cultivo com 40% de inóculo inicial, no oitavo dia de cultivo e depois houve uma redução drástica na densidade celular,

correspondendo a fase de declínio do cultivo. Os inóculos iniciais de 5%, 50% e 20% no cultivo autotrófico autoclavado, apresentaram respectivamente uma densidade de $1,65 \times 10^7$ cel/mL, $1,74 \times 10^7$ cel/mL e $1,32 \times 10^7$ cel/mL, ambas no nono dia de cultivo, indicando que houve um crescimento exponencial. A DCM_{ax} que ocorreu nos inóculos iniciais de 10% e 30% foi no décimo dia de cultivo com $9,30 \times 10^6$ cel/mL e $2,08 \times 10^7$ cel/mL.

A Figura 29 apresenta os resultados de densidade celular do cultivo autotrófico com efluente não autoclavado. No inóculo inicial de 5%, observou uma maior densidade no décimo segundo dia de cultivo com $1,34 \times 10^7$ cel/mL e logo após notou-se um decréscimo na curva. Para o inóculo de 10%, o crescimento atingiu uma DCM_{ax} no 11º dia de cultivo com $9,81 \times 10^6$ cel/mL. A DCM_{ax} com inóculo inicial de 20%, obteve um valor de $1,22 \times 10^7$ cel/mL, no 8º dia de cultivo. Nos cultivos com inóculos iniciais de 10% e 20%, foi possível observar a presença de organismos predadores. No 9º dia de cultivo, o inóculo inicial de 30% obteve uma DCM_{ax} de $2,14 \times 10^7$ cel/mL. Já no cultivo com 40%, a densidade máxima foi de $1,97 \times 10^7$ cel/mL no 12º dia. E por fim, no inóculo inicial de 50%, a DCM_{ax} ocorreu no 10º dia de cultivo com $1,99 \times 10^7$ cel/mL.

Comprando os resultados de densidade celular das Figuras 26 e 27, foi possível perceber uma maior densidade no cultivo não autoclavado, podendo então atribuir a interação da espécie de microalga, *D. subspicatus* com bactérias presentes no esgoto pós-FAS, utilizado como meio de cultivo, produzindo um efeito positivo no crescimento das células microalgais.

Figura 26 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus*, nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente autoclavado.

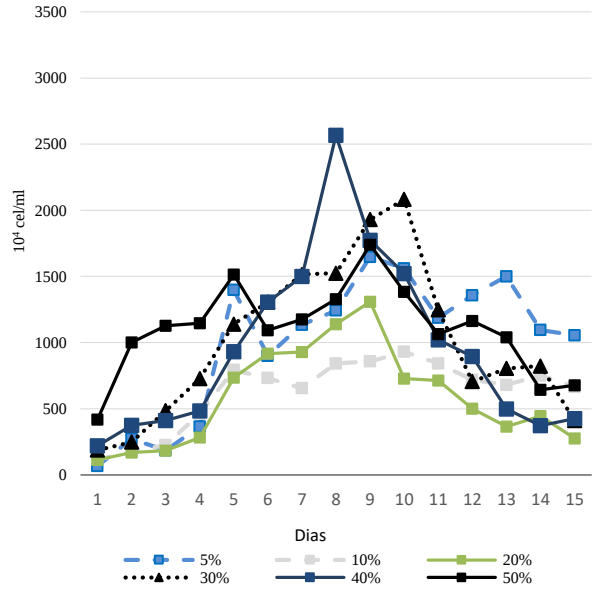
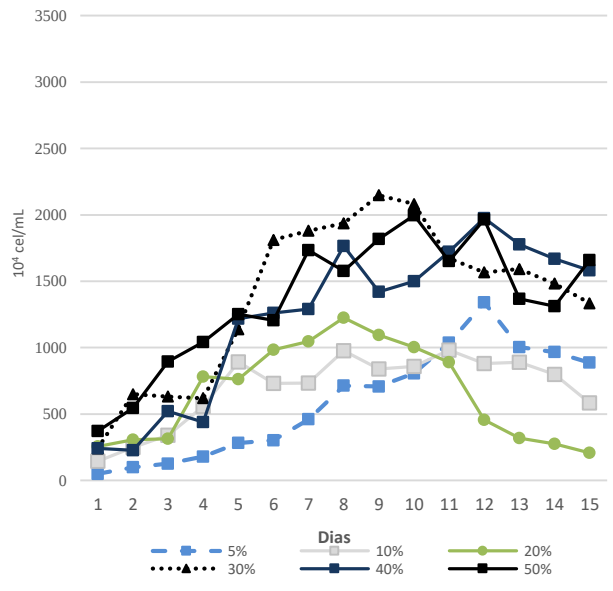


Figura 2723 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus*, nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente não autoclavado.



Na Tabela 15 estão apresentados os resultados de taxa de crescimento dos cultivos autotróficos com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% com efluente pós-FAS, autoclavado e não autoclavado. A maior taxa de crescimento foi verificada no cultivo com 30% de inóculo inicial ($0,989\text{ d}^{-1}$) em efluente não autoclavado.

Tabela 15 - Taxa de crescimento no cultivo autotrófico, com todos os inóculos iniciais no efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A).

Autotrófico	
Experimentos	Taxa de crescimento
5% N/A	$0,757\text{ d}^{-1}$
5% A	$0,335\text{ d}^{-1}$
10% N/A	$0,456\text{ d}^{-1}$
10% A	$0,482\text{ d}^{-1}$
20% N/A	$0,373\text{ d}^{-1}$
20% A	$0,469\text{ d}^{-1}$
30% N/A	$0,989\text{ d}^{-1}$
30% A	$0,451\text{ d}^{-1}$
40% N/A	$0,826\text{ d}^{-1}$
40% A	$0,360\text{ d}^{-1}$
50% N/A	$0,322\text{ d}^{-1}$
50% A	$0,303\text{ d}^{-1}$

As maiores taxas de crescimento observadas no cultivo autotrófico foram nos inóculos iniciais de 30% no efluente pós-FAS não autoclavado, seguidos dos inóculos iniciais de 40% e 5%, ambos em efluente não autoclavado também.

No metabolismo heterotrófico em efluente autoclavado (Figura 28), todos os inóculos iniciais apresentaram uma baixa densidade celular ao longo dos quinze dias. O inóculo de 50% demonstrou $DC_{máx}$ de $8,12 \times 10^6$ cel/mL, no décimo dia de cultivo, valor muito inferior quando comparada as $DC_{máx}$ do cultivo autotrófico. Isso demonstra que a espécie *D. subspicatus* não conseguiu se desenvolver no cultivo totalmente sem luz.

Para o metabolismo heterotrófico não autoclavado, o inóculo inicial de 50% atingiu no décimo terceiro dia uma $DC_{máx}$ de $4,38 \times 10^6$ cel/mL, conforme demonstrado na Figura 29.

Figura 28 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus*, nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo heterotrófico, em efluente autoclavado.

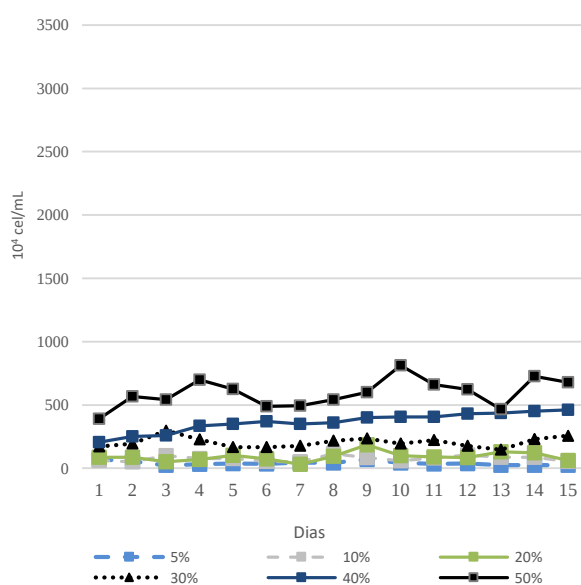
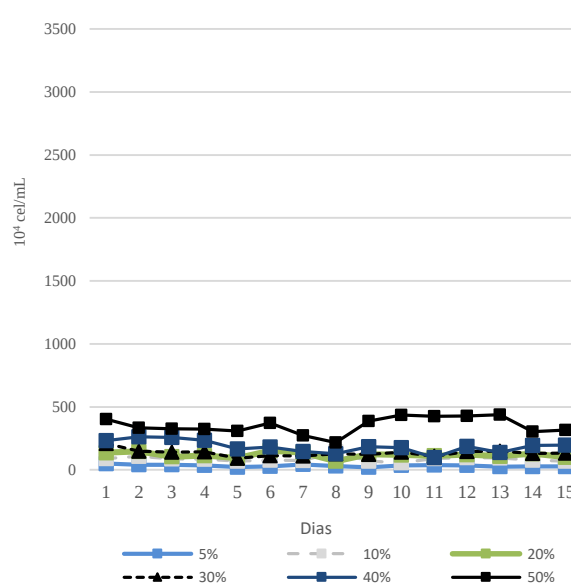


Figura 29 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico, em efluente não autoclavado.



Na Tabela 16 estão apontados os valores de taxa de crescimento para o cultivo heterotrófico, em todos os inóculos (5%, 10%, 20%, 30%, 40%, e 50%), em efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado. As maiores taxas de crescimento do metabolismo heterotrófico foram bem inferiores quando comparadas aos experimentos com metabolismo autotrófico e mixotrófico em efluente autoclavado e não autoclavado. E a taxa de crescimento que apresentou

maior valor foi no inóculo de 30% em efluente autoclavado, seguido do inóculo de 40% em efluente não autoclavado e na concentração de 20% em efluente autoclavado.

Quando se comparou os inóculos iniciais no cultivo com metabolismo heterotrófico, através do teste estatístico de Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$) e Dunn, só houve diferença estatística no cultivo com autoclavagem.

Tabela 16 - Taxa de crescimento no cultivo heterotrófico, com todos os inóculos iniciais no efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A).

Heterotrófico	
Experimentos	Taxa de crescimento
5% N/A	0,189 dia ⁻¹
5% A	0,332 dia ⁻¹
10% N/A	0,358 dia ⁻¹
10% A	0,284 dia ⁻¹
20% N/A	0,287 dia ⁻¹
20% A	0,369 dia ⁻¹
30% N/A	0,206 dia ⁻¹
30% A	0,422 dia ⁻¹
40% N/A	0,372 dia ⁻¹
40% A	0,290 dia ⁻¹
50% N/A	0,165 dia ⁻¹
50% A	0,580 dia ⁻¹

A Figura 30 apresenta os resultados de densidade celular com metabolismo mixotrófico, efluente pós-FAS autoclavado e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. O inóculo inicial de 5% atingiu uma DCM_{ax} de $1,73 \times 10^7$ cel/mL a partir do quarto dia de cultivo. No inóculo inicial de 10% a DCM_{ax} foi de $1,08 \times 10^7$ cel/mL no 11º dia. O inóculo inicial de 20%, a DCM_{ax} foi no 8º dia de cultivo com o valor de $1,14 \times 10^7$ cel/mL. Já os inóculos iniciais de 30% e 40% as maiores densidades em ambos foram observadas no 12º dia, com valores de $1,54 \times 10^7$ cel/mL e $1,28 \times 10^7$ cel/mL respectivamente. E no cultivo com o inóculo inicial de 50%, a DCM_{ax} ocorreu no 9º dia com o valor de $1,57 \times 10^7$ cel/mL, seguida de uma redução nos dias subsequentes.

E para o metabolismo mixotrófico não autoclavado demonstrado na Figura 30, o inóculo de 5% ocorreu no 13º dia com o valor de $1,62 \times 10^7$ cel/mL, seguida de uma queda brusca caracterizando dessa forma um declínio na curva. O inóculo inicial de 10% houve um

crescimento no 14º e 15º dia com densidade de $7,55 \times 10^6$ cel/mL no último dia de cultivo. A fase exponencial de crescimento foi a partir do 4º dia de cultivo e a DCM_{ax} ocorreu no 9º dia, no cultivo com 20% ($1,14 \times 10^7$ cel/mL), seguindo de uma redução na densidade, até que nos 14º e 15º dias de cultivo ocorreu um aumento, apresentando uma densidade de $8,45 \times 10^6$ cel/mL, no último dia do experimento. No cultivo de 30% a ocorreu um aumento na densidade no décimo segundo dia com o valor apontado de $1,70 \times 10^7$ cel/mL. No de 40% a DCM_{ax} foi de $1,64 \times 10^7$ cel/mL no 12º dia e depois desse dia houve um declínio considerável na curva de crescimento. E por fim, no inóculos de 50%, houve no do 9º dia de cultivo uma densidade de $1,73 \times 10^7$ cel/mL. No cultivo mixotrófico não autoclavado foi possível detectar a presença de organismos predadores.

Figura 30 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus*, nos inóculos de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico, em efluente autoclavado.

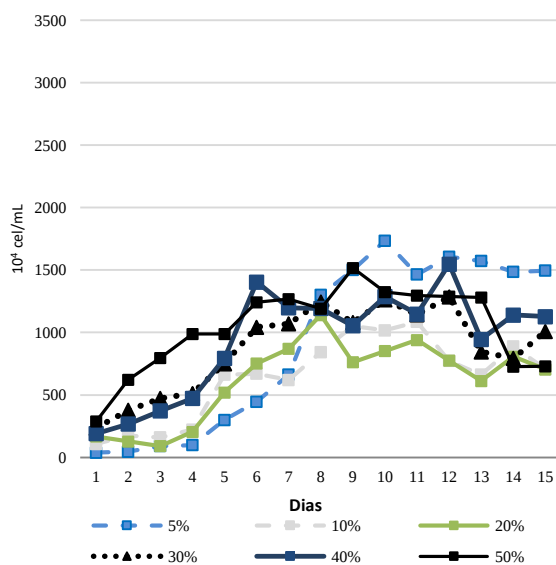
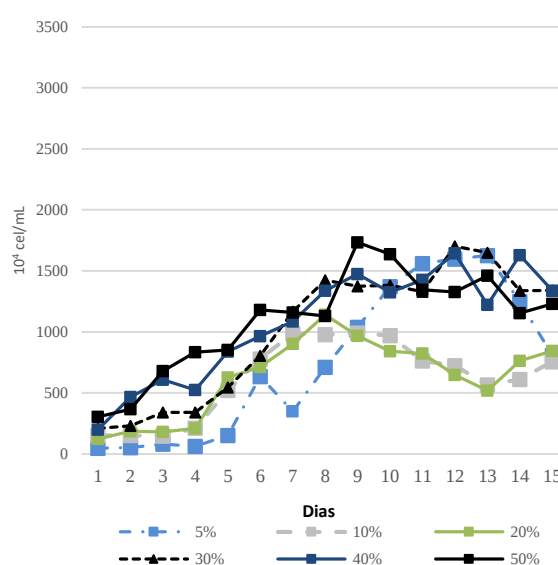


Figura 31 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus*, nos inóculos de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico, em efluente não autoclavado.



Foi aplicado os testes de Kruskal-Wallis ($\alpha= 0,05$) e Dunn nos resultados do cultivo mixotrófico e não houve diferença estatística significativa quando foi verificada a interferência da autoclavagem ou não do efluente utilizado como meio de cultivo. Desta forma, a autoclavagem do efluente utilizado no cultivo não gerou efeitos na densidade celular no cultivo com metabolismo mixotrófico.

Na Tabela 17, estão expostos os valores da taxa de crescimento das microalgas no cultivo mixotrófico, em todos os inóculos no efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado. No cultivo mixotrófico os maiores valores de taxa de crescimento foram a de 5% em efluente

pós-FAS autoclavado seguido de 50% em efluente autoclavado e 20% não autoclavado. Nesse tipo de cultivo a remoção de bactérias e outros microrganismos predadores, através da esterilização do efluente, não geraram impactos negativos no crescimento das microalgas.

Tabela 17. Taxa de crescimento no cultivo mixotrófico, com todas as concentrações no efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A).

Mixotrófico	
Experimentos	Taxa de crescimento
5% N/A	0,397 dia ⁻¹
5% A	1,159 dia ⁻¹
10% N/A	0,306 dia ⁻¹
10% A	0,454 dia ⁻¹
20% N/A	0,619 dia ⁻¹
20% A	0,468 dia ⁻¹
30 N/A	0,323 dia ⁻¹
30% A	0,290 dia ⁻¹
40% N/A	0,360 dia ⁻¹
40% A	0,400 dia ⁻¹
50% N/A	0,411 dia ⁻¹
50% A	0,728 dia ⁻¹

Li et al. (2012) estudaram a viabilidade de crescimento de *Chlorella sp.* em esgoto doméstico concentrado, avaliando a remoção de nutrientes e produção de biodiesel. Os experimentos foram realizados com pré-tratamento das águas residuárias, onde parte foi autoclavada à 121 °C para remoção de microrganismos predadores. A taxa de crescimento de para algas cultivadas com esgoto bruto foi de 0,1677 d⁻¹ e para algas cultivadas com esgoto autoclavado, foi de 0,4794 d⁻¹. Ou seja, as algas cultivadas com esgoto autoclavado tiveram uma taxa de crescimento maior, quando comparada às taxas de crescimento utilizando o esgoto não autoclavado, divergindo dos resultados do presente estudo quando considerada a espécie *D.subspicatus* com metabolismo autotrófico, porém, corroborando com os resultados do cultivo mixotrófico. De acordo com o autor a diminuição do crescimento de algas no efluente concentrado não autoclavado poderia ser devido aos altos níveis de compostos tóxicos e bactérias competitivas encontradas no efluente.

As águas residuárias fornecem um habitat para uma grande variedade de microrganismos e alguns podem ser prejudiciais para o crescimento de microalgas, agindo como

concorrentes, parasitas ou predadores. Contudo, a presença de microrganismos pode melhorar o desempenho do sistema devido à interação com bactérias, que pode até aumentar o crescimento de microalgas. As microalgas podem melhorar a atividade das bactérias, liberando certos compostos extracelulares e oxigênio, enquanto o crescimento bacteriano pode melhorar o metabolismo microalgal, reduzindo a concentração de O_2 , liberando CO_2 no meio e degradando compostos maiores. Avaliando os resultados de densidade celular e dos testes estatísticos aplicados foi possível concluir que a autoclavagem do efluente não apresentou melhoria na densidade celular, levando em consideração os três metabolismos testados. Apesar de ter sido verificado que autoclavagem do efluente conseguiu reduzir a presença de microrganismos predadores (rotíferos, protozoários e etc.), isto não trouxe mudanças expressivas para aumento da densidade celular.

Foi avaliada a diferença estatística entre os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico também através dos testes Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) e Dunn. Os resultados obtidos demonstraram que houve diferença estatística quando realizada a comparação entre o metabolismo autotrófico e o heterotrófico e na comparação dos metabolismos mixotrófico e o heterotrófico. Entretanto, não houve diferença estatística significativa quando houve a comparação entre o metabolismo autotrófico e o mixotrófico.

Diante dos resultados estatísticos, a espécie *D. subspicatus* teve um crescimento celular satisfatório utilizando o metabolismo mixotrófico e que foi semelhante ao cultivo autotrófico, já que não houve diferenças estatísticas entre os resultados. No cultivo mixotrófico, a espécie de microalgas utilizou apenas as fontes de carbono presente no esgoto no período sem iluminação e realizou a fotossíntese no restante do tempo.

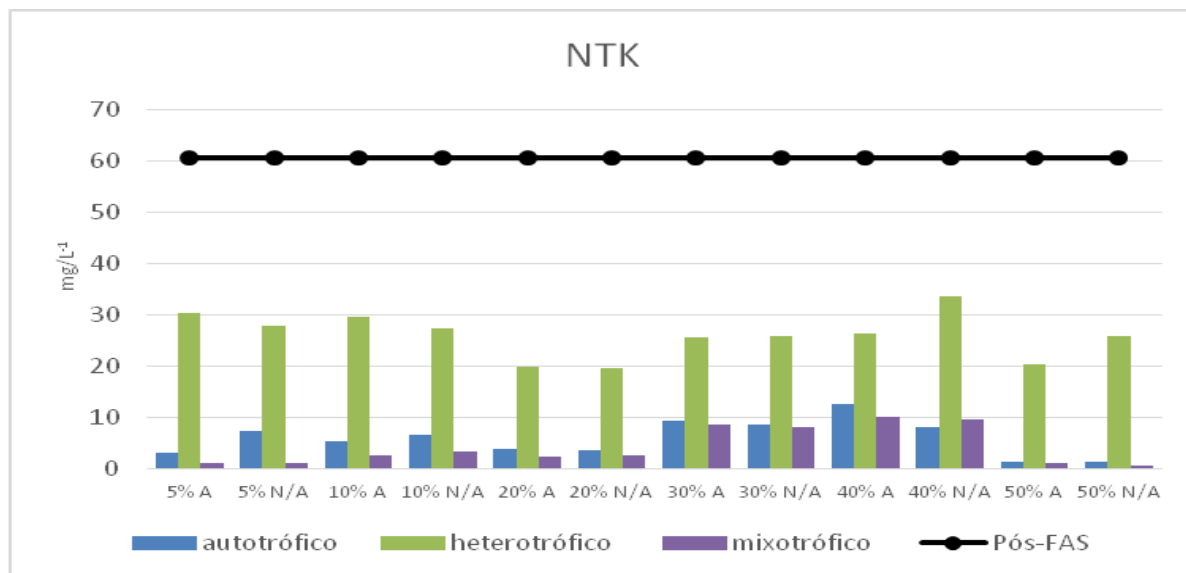
5.2.2 Remoção de nutrientes e matéria orgânica do cultivo de *Desmosdemus subspicatus* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-FAS com e sem autoclavagem

Após o experimento de cultivo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado foram realizadas as análises físico-químicas para avaliar as eficiências de remoção de nutrientes e matéria orgânica residual.

Para a avaliação da remoção de NTK estão apresentadas na Figura 32 as concentrações após o cultivo utilizando o efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado considerando todos

os inóculos iniciais da espécie de microalga *Desmodesmus subspicatus*. Os valores de eficiência de remoção estão demonstrados na Tabela 19.

Figura 32. Resultados de NTK após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A), com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos aplicados.



A remoção de NTK no cultivo autotrófico foi elevada (entre 84,00% e 98,00%), houve redução também no cultivo heterotrófico e o percentual de remoção ficou entre 44,00% e 66,00% e no cultivo mixotrófico, que também foi bastante significativa o percentual de remoção ficou entre 83,00% e 99,00%. Não houve diferenças expressivas na remoção quando comparado a autoclavagem do efluente pós-FAS.

Foi observado que a remoção de NTK foi muito acentuada no cultivo mixotrófico, nos inóculos iniciais de 5% em efluente autoclavado e não autoclavado, como também no inóculo inicial de 50% em efluente autoclavado e não autoclavado. Quando comparada as mesmas concentrações para os cultivos com metabolismo autotrófico e heterotrófico, observou-se que o cultivo autotrófico manteve uma excelente remoção de NTK, mesmo o heterotrófico que obteve uma baixa densidade celular (5%- $3,39 \times 10^5$ cel/mL e 50%- $2,53 \times 10^6$ cel/mL), houve também uma remoção significativa dos nutrientes conforme a Tabela 18.

Tabela 18 - Resultado da eficiência de remoção de NTK do efluente pós-FAS, com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado (A) e não autoclavado (N/A) e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

Eficiência de Remoção de NTK			
Autotrófico			
5% A	94,90%	5% N/A	87,90%
10% A	91,23%	10% N/A	89,25%
20% A	93,71%	20% N/A	94,21%
30% A	84,62%	30% N/A	86,10%
40% A	79,16%	40% N/A	86,77%
50% A	98,00%	50% N/A	97,80%
Heterotrófico			
5% A	49,60%	5% N/A	58,92%
10% A	49,38%	10% N/A	50,54%
20% A	47,89%	20% N/A	46,57%
30% A	57,65%	30% N/A	57,32%
40% A	56,66%	40% N/A	44,42%
50% A	66,33%	50% N/A	57,45%
Mixotrófico			
5% A	98,50%	5% N/A	98,3%
10% A	95,70%	10% N/A	94,71%
20% A	96,36%	20% N/A	95,86%
30% A	85,94%	30% N/A	86,77%
40% A	83,62%	40% N/A	84,12%
50% A	98,40%	50% N/A	99,10%

Fonte: A Autora, 2016.

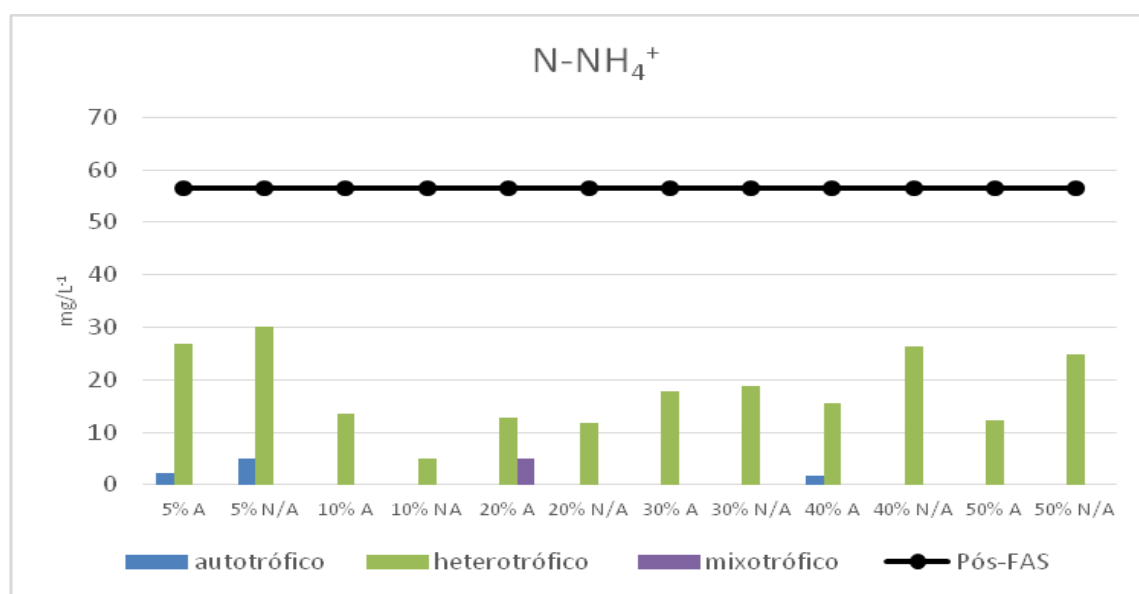
Os percentuais de remoção de NTK foram maiores nos inóculos iniciais de 50% autoclavado com 98,00% e 66,33% para os metabolismos autotrófico e heterotrófico, respectivamente e de 99,10% no metabolismo mixotrófico em efluente não autoclavado.

Li et al. (2012), avaliando a remoção de matéria orgânica e nutriente do efluente concentrado com e sem autoclavagem durante experimento utilizando a espécie *Chlorella sp.* E metabolismo autotrófico e com 14 dias de duração, encontrou os seguintes resultados para a eficiência de remoção de NTK que foi de 89,9% em efluente autoclavado e 89,1% em não

autoclavado. Os percentuais de remoção de NTK do presente estudo superaram os valores apresentados no estudo de Li et al. (2012).

Em relação à remoção de nitrogênio amoniacal (N-NH_4^+), foi eficiente nos cultivos autotrófico e mixotrófico atingindo a remoção de 100,00% para a grande maioria das inóculos iniciais aplicados (Figura 33).

Figura 33- Resultados de N-NH_4^+ após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A), com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicados.



O metabolismo heterotrófico apresentou uma remoção relevante e no inóculo inicial de 30% em efluente autoclavado atingiu também 100,00% de remoção de nitrogênio amoniacal (Tabela 9).

De acordo com Perez-Garcia et al. (2011) o consumo de nitrogênio orgânico por microalgas ocorre sob condições tanto autotróficas quanto heterotróficas. Todos os compostos que possuem nitrogênio orgânico são capazes de dar suporte ao crescimento sob luz ou escuro. Rendimentos de crescimento com compostos de nitrogênio orgânico são geralmente comparáveis aqueles obtidos com nitrato ou amônia, embora as taxas de crescimento variem muito, dependendo da fonte de nitrogênio e da fonte de carbono. A partir dos dados de pesquisas científicas sobre o metabolismo de nitrogênio em condições heterotróficas, fica claro que o uso da fonte de nitrogênio pela maioria das espécies de microalgas é em ordem decrescente: amônia > nitrato > nitrito > ureia.

Segundo Oswald (1988), nas lagoas fotossintéticas o nitrogênio orgânico é convertido em nitrogênio amoniacal ou em nitrogênio gasoso que é produzido através da desnitrificação heterotrófica na parte anaeróbia da lagoa e é libertado para a atmosfera juntamente com o metano. Dessa maneira, o nitrogênio amoniacal é absorvido pelas microalgas durante o seu crescimento. O excesso é convertido em hidróxido de amônio, que a pH elevado é liberado para o ar durante agitação suave, volatilizando a amônia.

Observou-se que no 15º dia de cultivo, houve uma remoção total de nitrogênio amoniacal nos cultivos autotrófico e mixotrófico. Correlacionando com os resultados de densidade celular dos cultivos autotrófico e mixotrófico, as curvas de crescimento evidenciaram que a fase de declínio que foi iniciada a partir do décimo dia de cultivo pode estar relacionada com a falta desse nutriente no meio.

Tabela 19 - Resultado da eficiência de remoção N-NH₄⁺ do efluente pós-FAS, com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

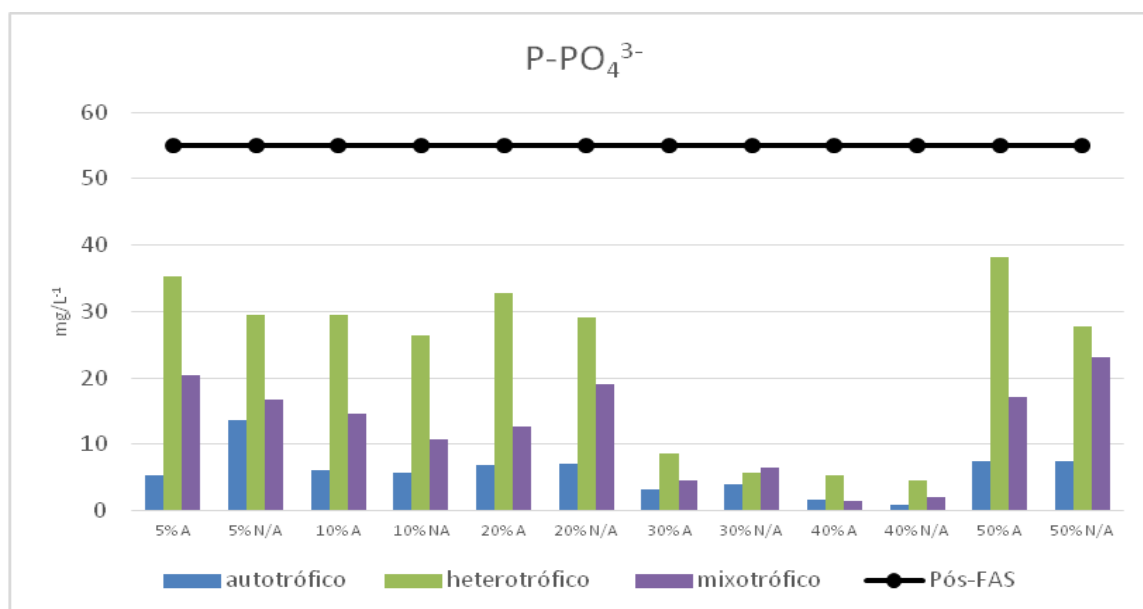
Eficiência de Remoção de N-NH ₄ ⁺			
Autotrófico			
5% A	96,00%	5% N/A	91,10%
10% A	100,00%	10% N/A	100,00%
20% A	100,00%	20% N/A	100,00%
30% A	100,00%	30% N/A	100,00%
40% A	97,00%	40% N/A	100,00%
50% A	100,00%	50% N/A	100,00%
Heterotrófico			
5% A	52,00%	5% N/A	47,00%
10% A	76,00%	10% N/A	91,00%
20% A	77,00%	20% N/A	79,00%
30% A	100,00%	30% N/A	66,83%
40% A	72,60%	40% N/A	53,47%
50% A	78,00%	50% N/A	56,00%
Mixotrófico			
5% A	94,00%	5% N/A	100,00%
10% A	100,00%	10% N/A	100,00%
20% A	100,00%	20% N/A	100,00%
30% A	100,00%	30% N/A	100,00%
40% A	100,00%	40% N/A	100,00%
50% A	100,00%	50% N/A	100,00%

Fonte: A Autora, 2015.

Quanto à remoção de fósforo total ($P-PO_4^{3-}$) os resultados mostraram que a eficiência do metabolismo autotrófico nos inóculos iniciais de 30% e 40% autoclavado e não autoclavado foram superiores quando comparados aos outros dois tipos de metabolismo testados (Figura 34).

Correlacionando com a densidade nesse metabolismo na concentração de 30% e 40% com DCM_{ax} de $9,30 \times 10^6$ cel/mL e $2,08 \times 10^7$ cel/mL respectivamente e com a densidade no metabolismo autotrófico não autoclavado também nos inóculos iniciais de 30% e 40% obtiveram uma DCM_{ax} de $2,14 \times 10^7$ cel/mL e $1,97 \times 10^7$ cel/mL na devida ordem. Essa alta eficiência de remoção de fósforo total pela microalga *Desmodesmus subspicatus* nesses inóculos iniciais indicam que quanto maior a densidade, melhor a remoção, pois o meio com nutrientes em abundância, as células microalgais se multiplicam a medida em que vão absorvendo esse macroelemento.

Figura 34- Resultados de $P-PO_4^{3-}$ (fósforo total) após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado (A) e não autoclavado (N/A) com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicadas.



Na Tabela 20 estão apresentados os resultados em porcentagem da eficiência de remoção de fósforo total.

Foi possível constatar nos experimentos alta remoção de fósforo total, no cultivo autotrófico (75,00%-98,00%) e mixotrófico (entre 57% e 97%) e de acordo com estudos de

Song et al. (2008), o aumento nos valores de pH acima 8 na solução em um cultivo de microalgas pode causar coagulação e adsorção de fosfatos inorgânicos. No metabolismo autotrófico a média do pH no cultivo com 5% de inóculo inicial e não autoclavado foi de 10,1 e a média do pH para o cultivo com 5% de concentração inicial e no efluente autoclavado foi de 8,9. No cultivo mixotrófico com 5% a média de pH foi de 9,8 para o efluente não autoclavado e 9,5 no efluente autoclavado. Desta forma, a remoção de fósforo total também pode ser atribuída a precipitação de fosfato em decorrência dos altos valores de pH dos cultivos.

Vale ressaltar que os maiores percentuais ocorreram no cultivo mixotrófico, no inóculo inicial de 40% (entre 96,00% e 98,00%) autoclavado e não autoclavado respectivamente.

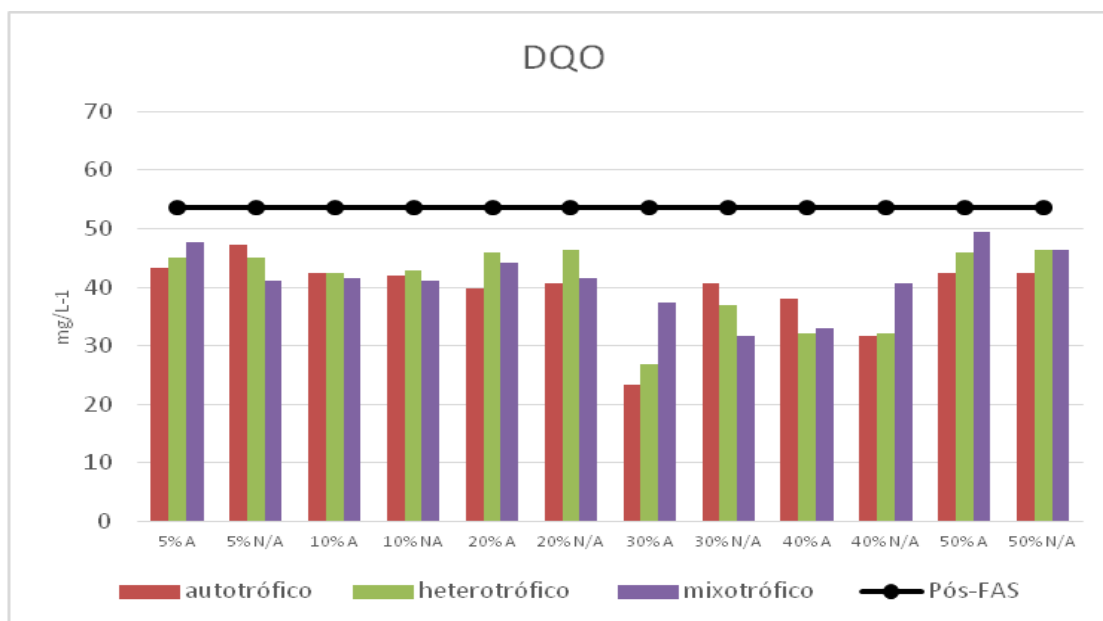
Tabela 20- Resultado da eficiência de remoção de fósforo total do efluente pós-FAS, após cultivos com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

Eficiência de Remoção de P-PO₄³⁻			
Autotrófico			
5% A	90,30%	5% N/A	75,30%
10% A	86,60%	10% N/A	86,30%
20% A	83,80%	20% N/A	83,60%
30% A	94,28%	30% N/A	92,64%
40% A	96,90%	40% N/A	98,54%
50% A	86,40%	50% N/A	86,40%
Heterotrófico			
5% A	41,20%	5% N/A	46,50%
10% A	46,42%	10% N/A	52,05%
20% A	40,43%	20% N/A	46,97%
30% A	84,46%	30% N/A	89,70%
40% A	90,45%	40% N/A	91,66%
50% A	30,70%	50% N/A	49,40%
Mixotrófico			
5% A	62,80%	5% N/A	69,40%
10% A	73,48%	10% N/A	80,39%
20% A	76,93%	20% N/A	65,31%
30% A	91,66%	30% N/A	88,39%
40% A	97,55%	40% N/A	96,24%
50% A	68,70%	50% N/A	57,90%

Fonte: A Autora, 2016.

Os resultados da DQO do presente estudo apresentaram uma baixa eficiência de remoção de matéria orgânica em todos os três tipos de cultivos (Figura 35). No entanto, deve-se levar em consideração que esta baixa eficiência de remoção, pode estar relacionada ao efluente utilizado para o cultivo. O efluente pós-filtro biológico aerado submerso (pós-FAS) apresentou um DQO baixa 53,89 mg.L⁻¹ e possivelmente possuía compostos com menor biodegradabilidade.

Figura 35 - Resultados de remoção DQO após o cultivo em efluente pós-FAS autoclavado e não autoclavado com os metabolismos autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, avaliando todos os inóculos iniciais aplicados.



Li et al. (2012), avaliando a remoção de matéria orgânica e nutriente do efluente concentrado autoclavado e não autoclavado, durante experimento utilizando a espécie *Chlorella sp.* com o metabolismo autotrófico e com 14 dias de duração, encontrou os seguintes resultados: remoção de 90,3% e 90,8% de DQO no efluente autoclavado e efluente não autoclavado, respectivamente. Contudo, na pesquisa citada, o efluente utilizado para o cultivo era concentrado, com DQO de $2.304.0 \pm 2.5$ mg.L⁻¹

As concentrações e os percentuais de eficiência de remoção de nutrientes e matéria orgânica para o cultivo heterotrófico apresentaram uma baixa remoção de DQO, inferior a 20% conforme a Tabela 21.

Tabela 21- Resultado da eficiência de remoção de DQO do efluente pós-FAS, após cultivos com metabolismo autotrófico, heterotrófico e mixotrófico, em efluente autoclavado e não autoclavado com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

Eficiência de Remoção de DQO			
Autotrófico			
5% A	19,40%	5% N/A	11,50%
10% A	42,52%	10% N/A	42,09%
20% A	39,9%	20% N/A	40,77%
30% A	56,78%	30% N/A	24,33%
40% A	29,21%	40% N/A	41,36%
50% A	21,10%	50% N/A	21,10%
Heterotrófico			
5% A	16,20%	5% N/A	16,20%
10% A	21,08%	10% N/A	20,28%
20% A	14,59%	20% N/A	13,86%
30% A	50,29%	30% N/A	31,64%
40% A	40,43%	40% N/A	40,55%
50% A	14,60%	50% N/A	18,80%
Mixotrófico			
5% A	12,80%	5% N/A	23,50%
10% A	29,39%	10% N/A	30,77%
20% A	21,70%	20% N/A	29,39%
30% A	30,82%	30% N/A	41,38%
40% A	38,93%	40% N/A	24,35%
50% A	8,10%	50% N/A	13,80%

Fonte: A Autora, 2016.

Mezzomo et al. (2010) avaliando o cultivo mixotrófico da espécie *Arthrospira platensis* utilizando efluente de suinocultura após tratamento biológico conseguiu os seguintes percentuais de remoção: fósforo (41,6%) na menor concentração de efluente adicionado ao meio de cultivo (5,0 e 8,5%), enquanto maiores remoções de DQO (84,3% e 79,3%) foram obtidas na maior concentração de efluente no meio de cultivo. Os percentuais de remoção de fósforo obtidos no presente estudo foram superiores aos encontrados por Mezzomo et al. (2010), contudo, as remoções de DQO mais elevadas encontradas neste experimento foram 56,78% e 50,29%, ou seja, inferiores ao estudo citado.

5.3 ETAPA 3- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO DA ESPÉCIE *D.SUBSPICATUS*, *S.OBLIQUUS* E *C.VULGARISEM* EFLUENTE PÓS-UASB

Para realização da etapa 3 do experimento foi utilizada a espécie *Desdesmuus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus* e *Chlorella vulgaris* com os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% utilizando efluente pós- UASB.

5.3.1 Crescimento de *D.subspicatus*, *S.obliquus* e *C.vulgaris* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, em metabolismos autotrófico e mixotrófico em efluente pós-UASB

Foi realizada a caracterização do efluente do ponto de coleta pós-UASB, que foi utilizado como meio de cultivo. Segue abaixo a Tabela 22 com resultados das medições de: pH, oxigênio dissolvido (mg.L^{-1}), temperatura ($^{\circ}\text{C}$) e condutividade ($\mu\text{S/cm}$) e na Tabela 23 estão os resultados de DQO (mg.L^{-1}), NTK (mg.L^{-1}), N-amoniaco (mg.L^{-1}), fósforo total (mg.L^{-1}) e razão N/P. Este efluente coletado foi armazenado e utilizado para todos os experimentos, ou seja, não foi necessária a realização de novas coletas para avaliar todas as variáveis desta etapa.

Tabela 22 - Resultados de medições do efluente pós-UASB na ETE Centro, Petrolina, PE.

Efluente	pH	Temperatura($^{\circ}\text{C}$)	OD (mg/L)	Condutividade($\mu\text{S/cm}$)
Pós-UASB	7,2	30,1	0,5	1.879

Fonte: A Autora, 2016.

Tabela 23 - Resultados das análises laboratoriais do efluente pós-UASB na ETE Centro.

Efluente	DQO mg.L^{-1}	NTK mg.L^{-1}	N-amoniaco mg.L^{-1}	Fósforo Total mg.L^{-1}
Pós- UASB	$56,0 \pm 9,22$	$75,2 \pm 12,60$	$57,1 \pm 7,44$	$31,9 \pm 6,98$

Fonte: A Autora, 2016.

Foram avaliados os metabolismos autotrófico e mixotrófico os inóculos iniciais de microalgas de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% em relação ao volume total do cultivo. Sendo assim, neste experimento, foram processadas 36 variáveis, utilizando 72 frascos (reatores), já que este procedimento foi realizado em duplicata. Na montagem do experimento foram realizadas as contagens das células. O metabolismo heterotrófico foi eliminado desta etapa da

pesquisa, já que não houve crescimento celular nem acúmulo lipídico conforme esperado, também não foi aplicado pré-tratamento no efluente utilizado no cultivo.

As Figuras 36 e 37 apresentam os resultados da curva de crescimento de *D. subspicatus* e *S. obliquus*, com metabolismo autotrófico considerando os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, e com metabolismo autotróficos e efluente pós-UASB. As maiores DCM_{ax} de *D. subspicatus* foram atingidas no último dia de cultivo, com inóculos iniciais de 40% $3,06 \times 10^7$ cel/mL e inóculo inicial de 30% com $2,68 \times 10^7$ cel/mL. As espécies *Scenedesmus obliquus* apresentou menores densidade celulares quando comparadas ao cultivo de *D. subspicatus* e a DCM_{ax} foi no cultivo com 50% de inóculo inicial ($1,74 \times 10^7$ cel/mL) no 12º dia de cultivo.

Figura 36 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico em efluente pós-UASB.

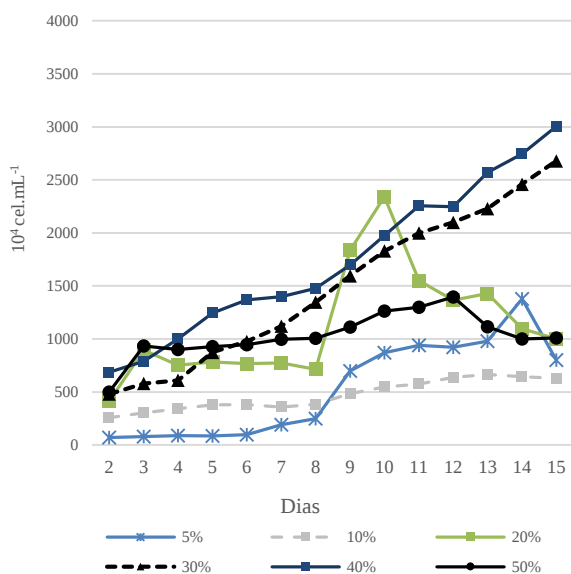
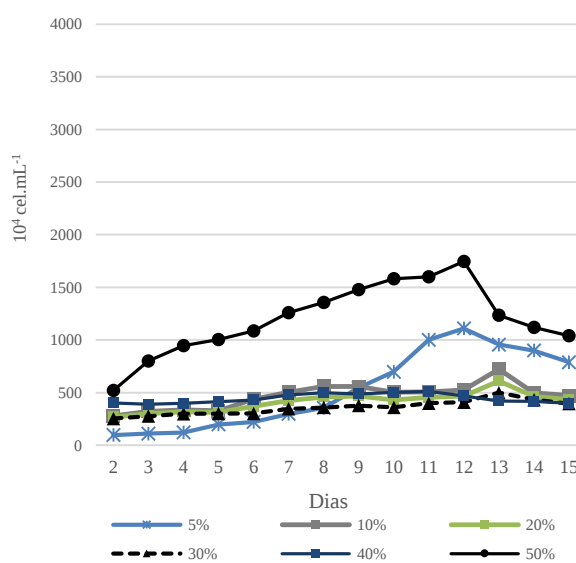
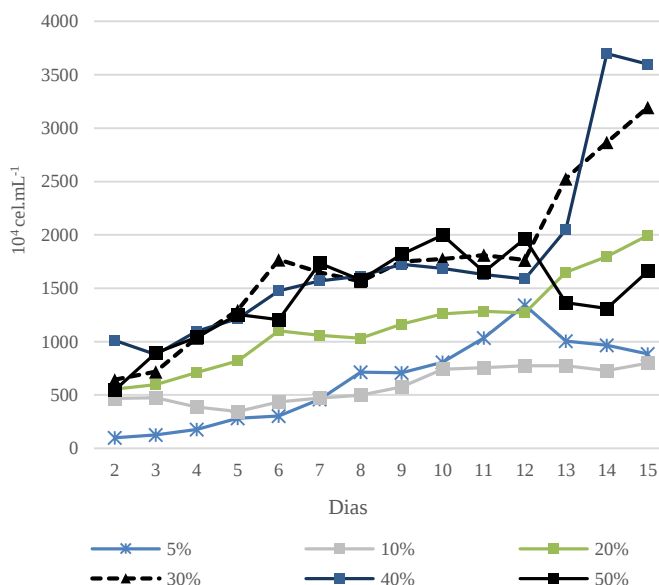


Figura 37 - Curva de crescimento da espécie *S. obliquus* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico, em efluente pós-UASB.



Na Figura 38 estão apresentados os resultados de densidade celular da espécie *C. vulgaris* com efluente pós-UASB com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%. A maiores DCM_{ax} também foram visualizadas no cultivo com 30% e 40% de inóculo inicial, $3,19 \times 10^7$ cel/mL, no 11º dia de cultivo e $3,69 \times 10^7$ cel/mL no 12º dia de cultivo. O cultivo autotrófico com 50% apresentou a densidade celular máxima no 10º dia com $1,99 \times 10^7$ cel/mL e com 5% a DCM_{ax} foi no 12º dia, com $1,34 \times 10^7$ cel/mL.

Figura 38 - Curva de crescimento da espécie *C. vulgaris* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo autotrófico, em efluente pós-UASB.



Nas Figuras 39 e 40 apresentam os resultados da curva de crescimento de *D. subspicatus* e *S. obliquus*, com metabolismo mixotrófico considerando os inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, e com metabolismo autotrófico e efluente pós-UASB. No cultivo com a espécie *D. subspicatus* as maiores DCM_{ax} foram encontradas também nos cultivos de 30% e 40% de inóculo inicial $2,35 \times 10^7$ cel/mL e $2,58 \times 10^7$ cel/mL, respectivamente. No cultivo com a espécie *S. obliquus* as maiores DCM_{ax} também foram encontradas nos inóculos iniciais de 30% e 40%, com $2,40 \times 10^7$ cel/mL e $2,69 \times 10^7$ cel/mL.

Figura 39 - Curva de crescimento da espécie *D. subspicatus* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.

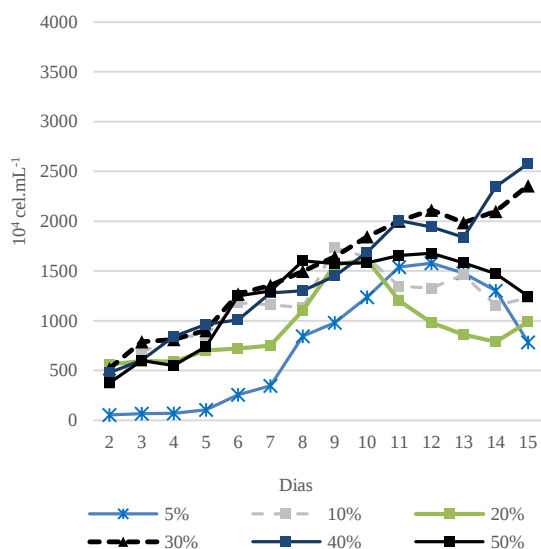
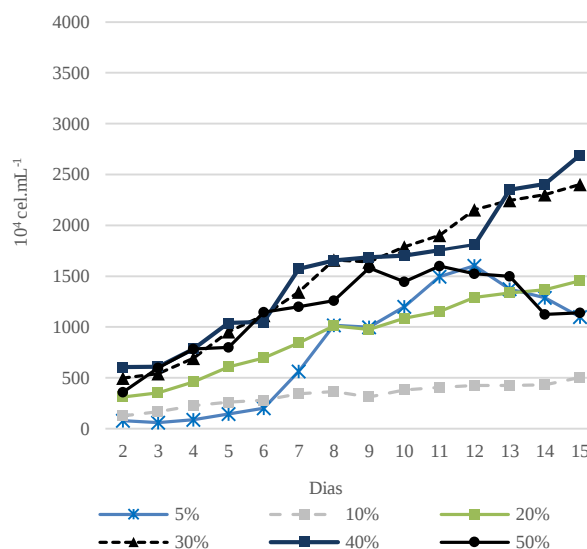
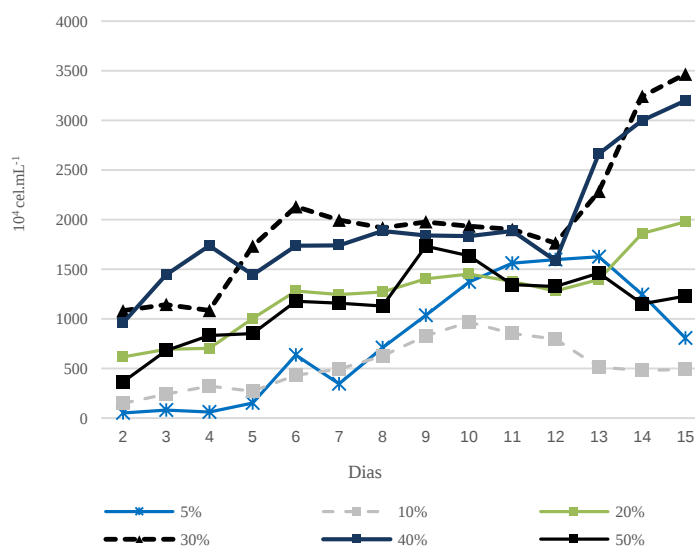


Figura 40 - Curva de crescimento da espécie *S. obliquus* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.



A Figura 41 apresenta a curva de crescimento de *C. vulgaris* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB. As maiores densidades celulares também foram observadas nos inóculos iniciais de 30% e 40%.

Figura 41 - Curva de crescimento da espécie *C. vulgaris* nos inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%, com metabolismo mixotrófico em efluente pós-UASB.



Na análise estatística dos resultados através dos testes de Kruskal-Wallis ($\alpha=0,05$) e teste de Dunn não apontaram diferenças significativas entre as densidades celulares das três espécies de microalgas cultivadas e considerando as comparações entre os metabolismos autotrófico e mixotrófico.

Hakalin et al. (2014) estudaram os efeitos do nitrogênio, fósforo e vitaminas para o crescimento de *Scenedesmus sp.* Após dez dias de cultivo, a menor densidade de algas ($4,2 \times 10^6$ cel/mL⁻¹) foi obtido no tratamento onde o meio de cultura não continha nitrogênio (N0) em sua composição. As mais altas densidades de algas foram alcançadas com os tratamentos 7 ($1,5 \times 10^7$ cel/mL) e 8 ($1,4 \times 10^7$ células/ mL), onde o meio de cultivo continha concentrações de nitrogênio e fósforo no nível máximo (N- 170, mg.L⁻¹ e P -53,0 mg.L⁻¹). No presente estudo as concentrações de nitrogênio e fósforo do efluente pós-UASB utilizado no cultivo eram inferiores (N- 57,1 mg.L⁻¹ e P-31,95 mg.L⁻¹) aos aplicados no estudo citado, entretanto, as densidades dos cultivos autotróficos e mixotróficos foram semelhantes aos resultados da pesquisa de Hakalin et al., (2014). Os resultados de densidade celular das três espécies cultivadas neste experimento demonstram que houve adaptação as características do efluente utilizado (pós-UASB).

De acordo com Kim et al. (2010), a espécie *Chlorella vulgaris* pode crescer usando dióxido de carbono e luz, através do processo fotossintético ou podem utilizar íons bicarbonato (HCO₃⁻) como uma fonte de carbono para a fotossíntese. Os resultados da pesquisa apontaram que a curva de crescimento apresentou-se em fase lag por 24 horas, que correspondeu ao tempo de adaptação à condição de águas residuárias e o carbono inorgânico não foi reduzido durante o período. Durante a fase de crescimento exponencial, a densidade celular de *Chlorella vulgaris* aumentou e a concentração decarbono inorgânicodiminuiu acentuadamente até 96 h, indicando reação fotossintética ativa. O pH da água residuária aumentou a partir da fase lag e na fase de crescimento exponencial. Comparando com os resultados da presente pesquisa, a fase lag do cultivo de *Chlorella vulgaris*, foi mais longa que 24h, e teve uma duração de 4 a 5 dias e correlacionando com os dados de consumo de carbono inorgânico, que se reflete no aumento do pH do meio, no presente estudo, houve uma aumento expressiva do pH a partir do início da fase exponencial, apresentando valores acima de 9 a partir 5º dia de cultivo, corroborando com os resultados da pesquisa supracitada.

Na Tabela 24 estão apresentados os resultados de taxa de crescimento das três espécies utilizadas neste experimento demonstrando que as maiores taxas foram encontradas no metabolismo mixotrófico e os cultivos com concentração inicial de 5%. Na pesquisa de Hakalin

et al., (2014) a taxa de crescimento máxima de *Scenedesmus sp.* foi de $0,62 \text{ d}^{-1}$ no cultivo onde o meio de cultivo continha concentrações de nitrogênio e fósforo no nível máximo (N- 170, mg.L^{-1} e P -53,0 mg.L^{-1}). Comparando com os resultados da presente pesquisa as taxas de crescimento de *S. obliquus* cultivadas com metabolismo autotrófico e mixotrófico e com inóculo inicial de 5%, foram superiores ($0,662 \text{ d}^{-1}$ e $0,813 \text{ d}^{-1}$) aos da pesquisa citada, mesmo com a utilização de água residuária com concentração menor de nitrogênio e fósforo.

Tabela 24 - Taxas de crescimento do cultivo das espécies *D. subspicatus*, *S.obliquus* e *C.vulgaris* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20% 30%, 40% e 50% e efluentes pós-UASB.

Experimento	Taxa de crescimento	
	Autotrófico	Mixotrófico
<i>D. subspicatus</i> 5%	$0,629 \text{ dia}^{-1}$	$0,900 \text{ dia}^{-1}$
<i>D. subspicatus</i> 10%	$0,234 \text{ dia}^{-1}$	$0,220 \text{ dia}^{-1}$
<i>D. subspicatus</i> 20%	$0,204 \text{ dia}^{-1}$	$0,267 \text{ dia}^{-1}$
<i>D. subspicatus</i> 30%	$0,359 \text{ dia}^{-1}$	$0,555 \text{ dia}^{-1}$
<i>D. subspicatus</i> 40%	$0,646 \text{ dia}^{-1}$	$0,279 \text{ dia}^{-1}$
<i>D. subspicatus</i> 50%	$0,495 \text{ dia}^{-1}$	$0,522 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 5%	$0,662 \text{ dia}^{-1}$	$0,813 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 10%	$0,033 \text{ dia}^{-1}$	$0,161 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 20%	$0,110 \text{ dia}^{-1}$	$0,213 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 30%	$0,731 \text{ dia}^{-1}$	$0,683 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 40%	$0,664 \text{ dia}^{-1}$	$0,694 \text{ dia}^{-1}$
<i>S. obliquus</i> 50%	$0,404 \text{ dia}^{-1}$	$0,284 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 5%	$0,383 \text{ dia}^{-1}$	$1,159 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 10%	$0,251 \text{ dia}^{-1}$	$0,201 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 20%	$0,342 \text{ dia}^{-1}$	$0,352 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 30%	$0,300 \text{ dia}^{-1}$	$0,405 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 40%	$0,660 \text{ dia}^{-1}$	$0,272 \text{ dia}^{-1}$
<i>C. vulgaris</i> 50%	$0,303 \text{ dia}^{-1}$	$0,377 \text{ dia}^{-1}$

Fonte: A Autora, 2016.

Azzez (2010) realizou um estudo utilizando a espécie *Chlorella vulgaris* com metabolismo autotrófico com efluente de uma indústria de produção de sementes e ração animal e verificou que a taxa de crescimento aumentou com a elevação da temperatura, até atingir o

valor máximo de $(1,5 \text{ dia}^{-1})$ a 30°C , e elevando a temperatura para 35°C , houve a diminuição da taxa de crescimento, o que significa que além de 30°C , a atividade das algas começa a diminuir e segundo o autor, este resultado está de acordo com a teoria das fases de crescimento para a cultura em batelada (fases de estacionária-exponencial-declínio). No presente estudo a temperatura do ambiente de cultivo foi controlada em 25°C e a maior taxa de crescimento da espécie *C. vulgaris* foi de $1,159 \text{ d}^{-1}$, sendo inferior ao da pesquisa citada.

5.3.2 Avaliação da remoção de nutrientes e matéria orgânica residual após cultivo de *D.subspicatus*, *S.obliquus* e *C.vulgaris* com inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-UASB

Após 7 e 15 dias de cultivo, alíquotas dos cultivos foram retiradas para avaliação da remoção de DQO, NTK, NH_4^+ e fósforo total dos experimentos com metabolismos autotrófico e mixotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30, 40% e 50% e efluente pós-UASB.

Os resultados da remoção de DQO do efluente utilizado nos cultivos das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris*, com metabolismo autotrófico estão demonstrados na Figura 42. Na avaliação dos dados de concentração, foi possível verificar que houve uma alta remoção de DQO em apenas 7 dias de cultivo e não houve um acréscimo significativo do percentual de remoção, considerando os resultados do 15º dia, ou seja, o consumo de matéria orgânica é mais rápido nos primeiros dias de cultivo. Os percentuais de remoção de DQO foram semelhantes entre as espécies (entre 79-83%). Na Figura 43 estão demonstrados os resultados de remoção de DQO no cultivo mixotrófico e é possível verificar que também houve uma redução significativa da concentração nos 7 primeiros dias de cultivo. Não houve diferenças expressivas entre as espécies, nem em relação ao inóculo inicial, na remoção de DQO.

Lau, Xu e Wu (1996) concluíram a partir dos resultados de remoção de matéria orgânica e nutrientes utilizando a espécie *Chlorella vulgaris*, que redução inicial rápida de DQO ($> 50\%$) nos primeiros dias de cultivo, não estava relacionado com o número de algas ou conteúdo de clorofila, sugerindo que a remoção de DQO foi principalmente devido ao metabolismo das bactérias existentes no efluente. É provável que também tenha ocorrido à remoção de DQO através do metabolismo bacteriano, principalmente no cultivo autotrófico, pois a microalgas não são capazes de metabolizar carbono orgânico de fontes externas com iluminação contínua.

Figura 42 - Resultados de DQO do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo autotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

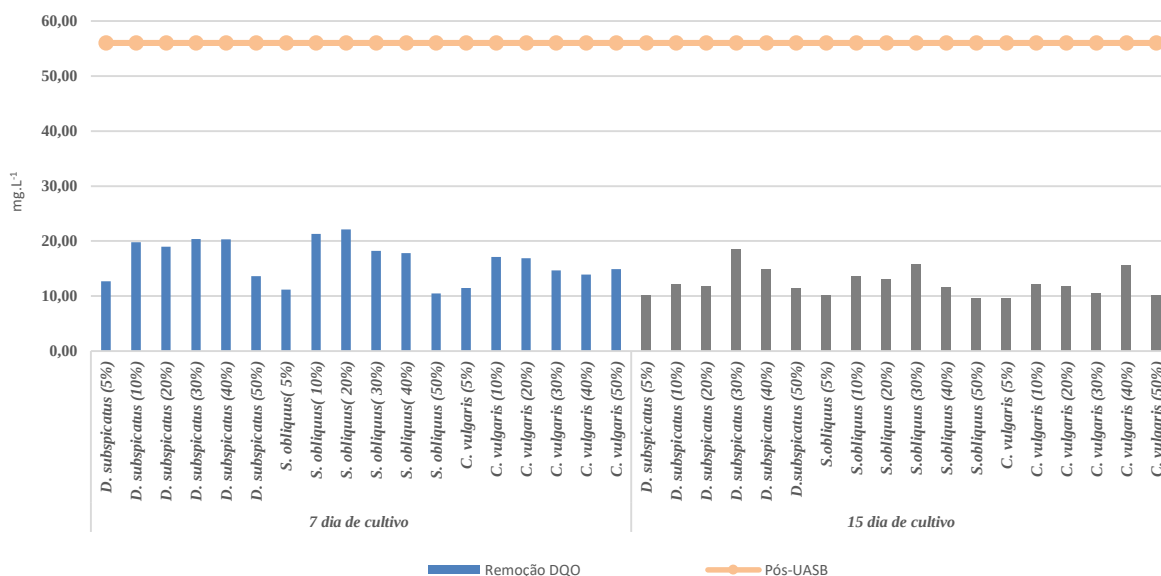
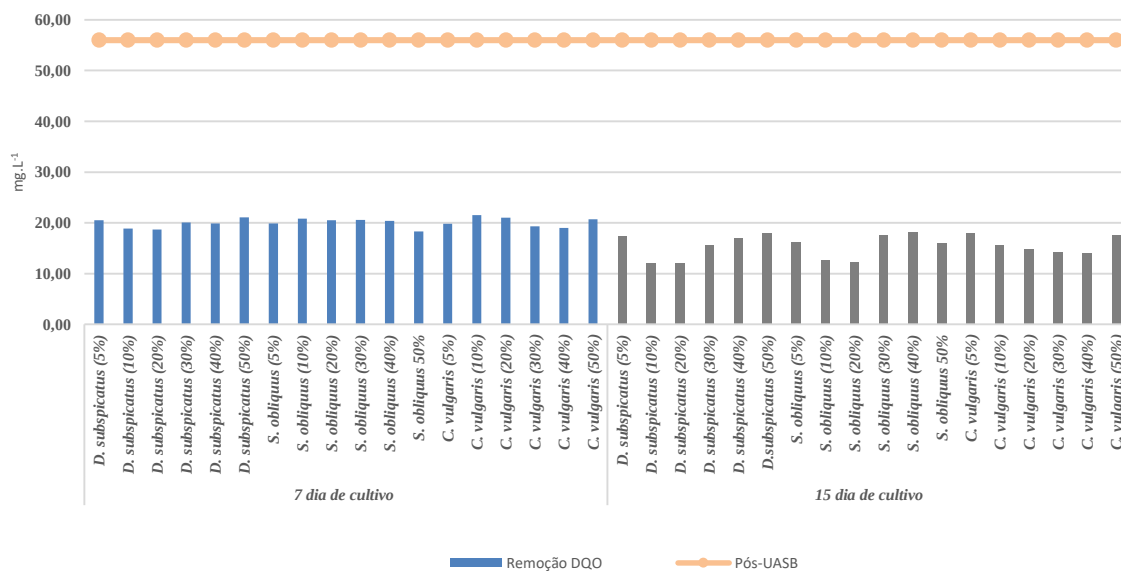


Figura 43 - Resultados de DQO do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo mixotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



Os resultados de remoção de NH_4^+ estão apresentados na Figura 44 e 45, considerando os cultivos autotrófico e mixotrófico, respectivamente. Houve uma alta assimilação nos primeiros 7 dias de cultivo e a remoção de NH_4^+ foi total no 15º dia de cultivo, para nos dois metabolismos, na maioria dos cultivos testados.

Figura 44- Resultados de NH_4^+ do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

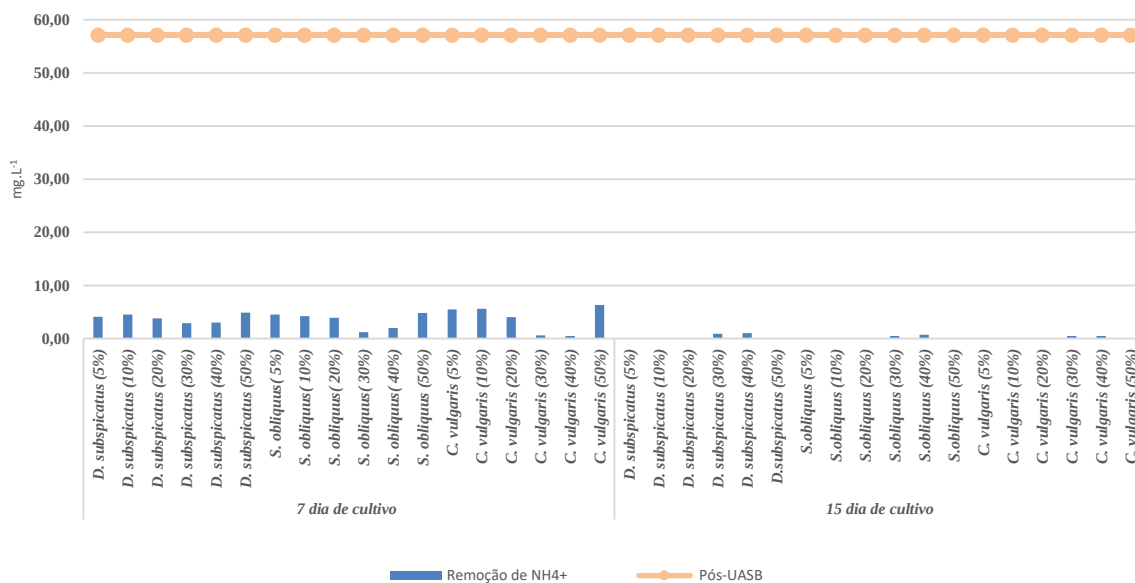
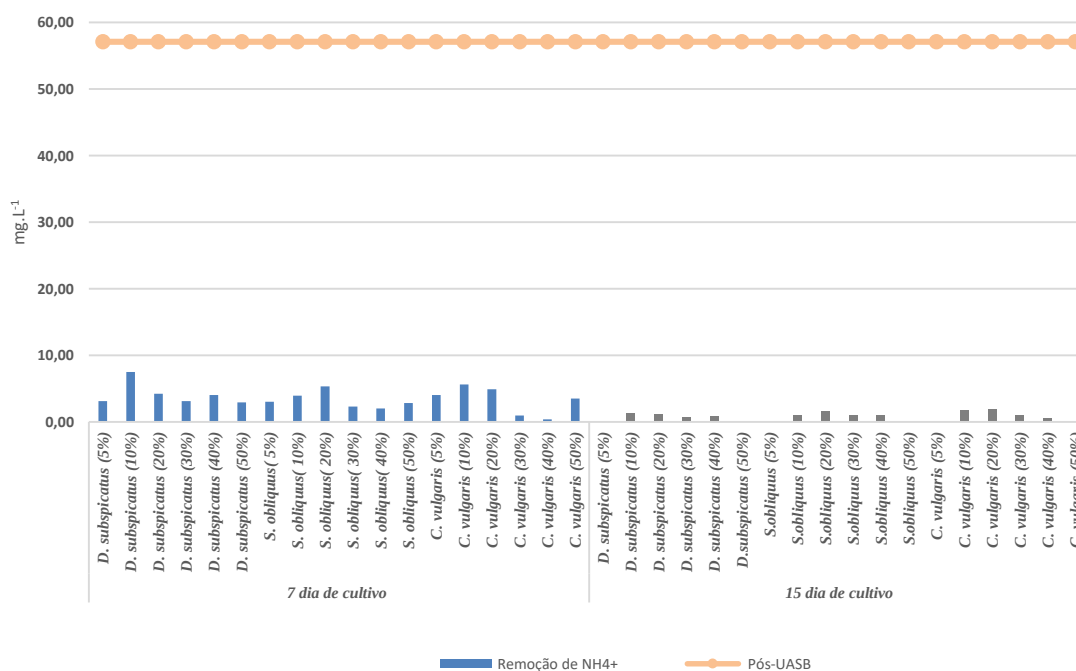


Figura 45- Resultados de NH_4^+ do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo mixotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



Na Figura 46 estão os dados de remoção de NTK do cultivo autotrófico, demonstrando uma alta eficiência de remoção no 15º dia e a espécie *C. vulgaris* foi a que se destacou, com remoção entre 92%-96%. Na Figura 47 estão os resultados do cultivo mixotrófico que

apresentou percentuais de remoção entre 84%-89% no cultivo com metabolismo autotrófico. Lau, Xu e Wu (1996) verificaram que a rápida remoção de NTK (> 60%), logo nos primeiros dias de cultivo, não estava relacionada ao número de algas e que provavelmente o consumo de NTK estava relacionado ao metabolismo das bactérias existentes no esgoto utilizado no cultivo. Neste experimento também houve uma rápida assimilação do NTK nos primeiros 7 dias de cultivo.

Figura 46 - Resultados de NTK (mg.L^{-1}) do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

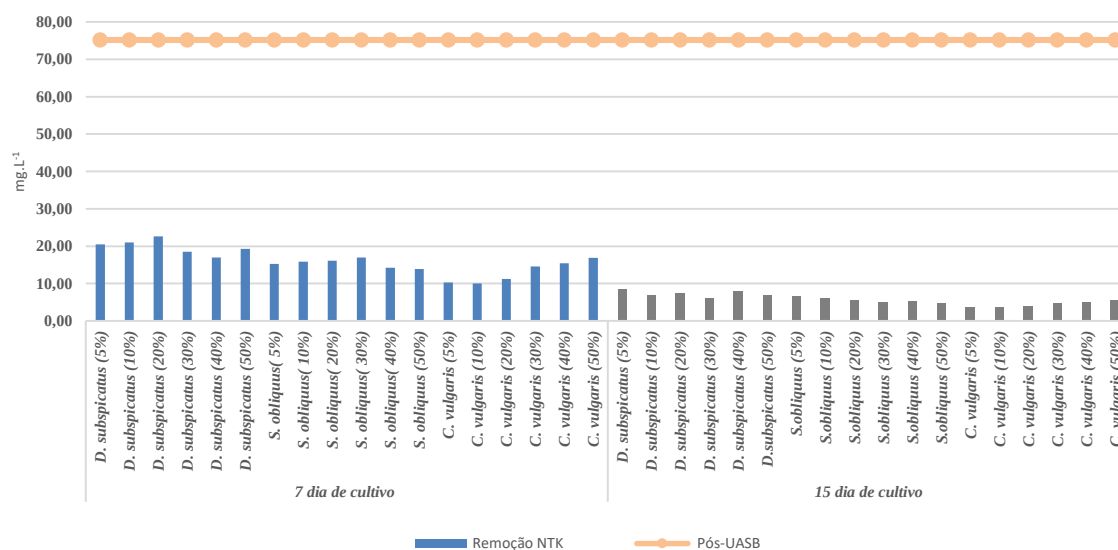
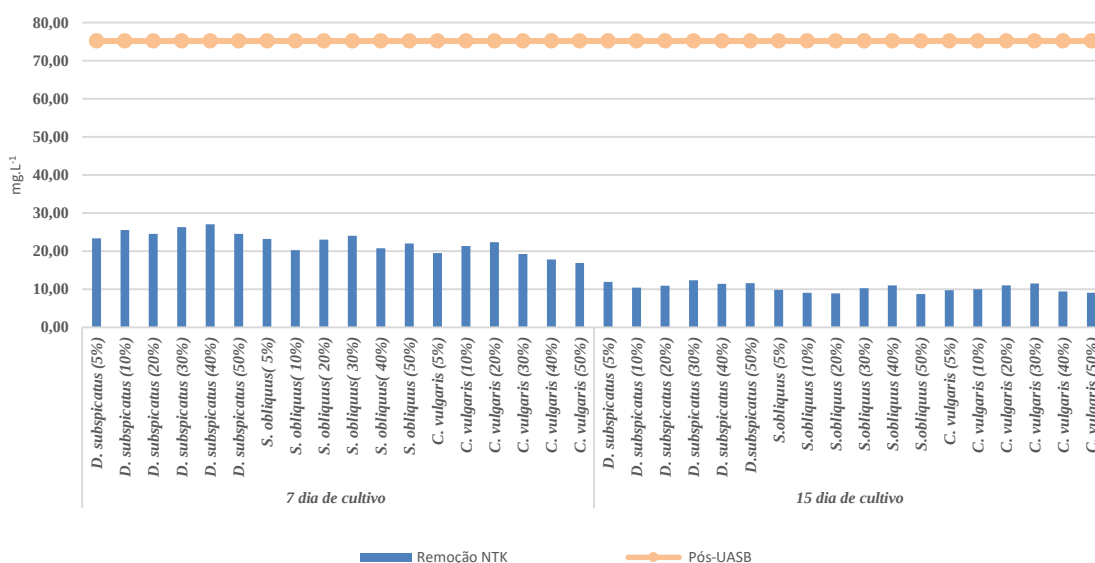


Figura 47- Resultados de NTK (mg.L^{-1}) do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo mixotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



Nas Figuras 48 e 49 estão os resultados de remoção de fósforo total dos cultivos com metabolismo autotrófico e mixotrófico, respectivamente. No cultivo autotrófico, ocorreu uma expressiva redução da concentração de P, logo nos primeiros 7 dias de cultivo e no 15º dia a eficiência mais elevada foi para a espécie *S. obliquus* (94%). No cultivo mixotrófico a eficiência de remoção de P no 15º dia esteve entre 92%-96%, considerando a três espécies cultivadas. Em relação aos inóculos iniciais das microalgas não houve as diferenças relevantes quanto à eficiência de remoção de fósforo total.

Figura 48 - Resultados de fósforo total do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo autotrófico, inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.

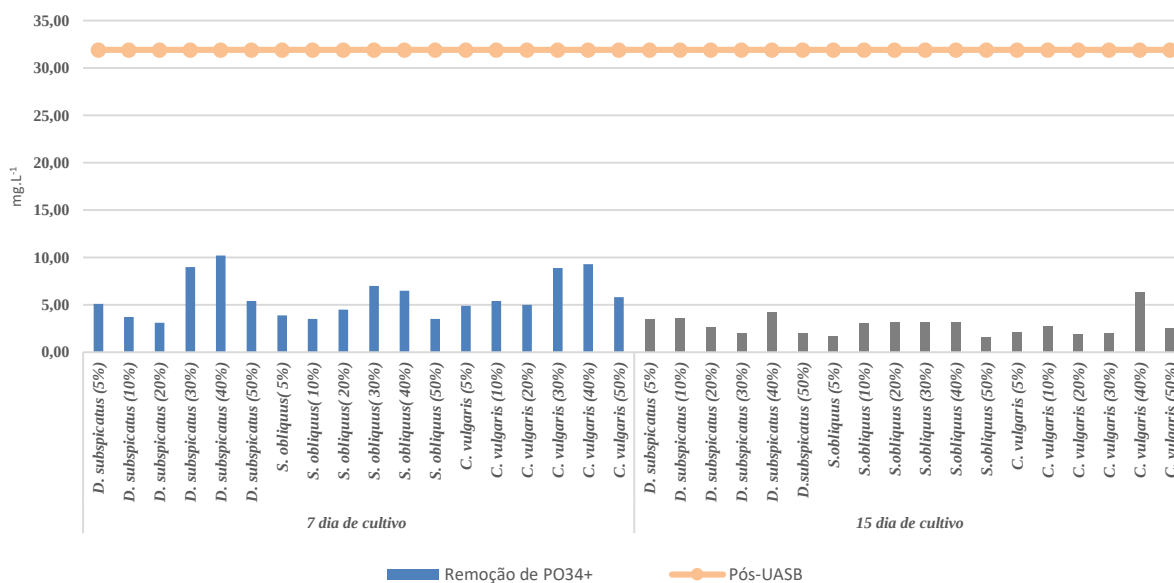
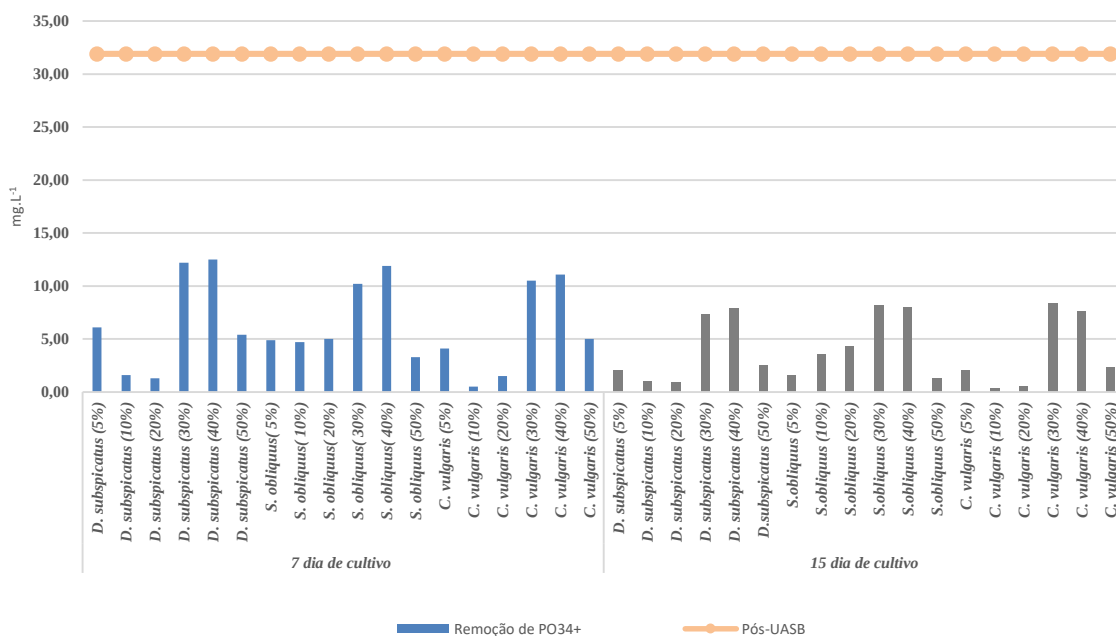


Figura 49 - Resultados de fósforo total do efluente após 7 e 15 dias das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismo mixotrófico, concentrações iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50%.



Wang et al.(2010) avaliaram o crescimento de *Chlorella* sp.com metabolismo autotrófico em esgoto doméstico de diferentes pontos do fluxo de processos de tratamento da

ETE. Foi avaliado o cultivo da espécie de microalga com o esgoto antes do tratamento primário (T1), após o tratamento primário (T2) e água residuária gerada a partir de desidratação do lodo em centrífuga (T4). As taxas de remoção de NH_4^+ foram 82,4%, 74,7% e 78,3% para os esgotos T1, T2 e T4 respectivamente. A remoção de fósforo total do esgoto T1, T2, T4 foi de 83,2%, 90,6% e 85,6%, respectivamente. A remoção de DQO foi de 50,9% para o esgoto T1, 56,5% para o esgoto T2, e 83,0% para o esgoto T4. As eficiências de remoção de NH_4^+ e de fósforo total encontradas neste experimento foram superiores aos da pesquisa citada, já que houve a remoção total de NH_4^+ e as eficiências de remoção de P foram superiores a 90% para as três espécies testadas, no final de cultivo. As eficiências de DQO ficaram entre 79-83%, considerando as três espécies.

Segundo Aslan e Kapdan (2006), as microalgas unicelulares da Divisão Chlorophyta têm demonstrado tolerância para crescimento em meio às condições de águas residuárias e são muito eficientes em acumular nutrientes de águas residuárias. Os gêneros *Chlorella* e *Scenedesmus* costumam predominar nas comunidades fitoplanctônicas em lagoas de oxidação (MASSERET et al., 2000) e em lagoas de alta taxa lagoas (CANOVAS et al., 1996). No entanto, há variação na eficácia entre as espécies da Divisão Chlorophyta, por exemplo, *Chlorella vulgaris* foi mais eficaz do que *Chlorella kessleri* em acumular N e P de águas residuárias em um estudo (TRAVIESO; BENITEZ; DUPEIRON, 1992), enquanto outro estudo descobriu que *Scenedesmus obliquus* cresceu melhor em esgoto doméstico que *C. vulgaris* (RUIZ-MARIN; MENDOZA-ESPINOSA, 2010).

No presente estudo não foram encontradas diferenças estatísticas em relação as densidades celulares de *S. obliquus* e *C. vulgaris*, então as duas espécies se adaptaram bem ao efluente e as condições cultivo aplicadas, divergindo dos resultados encontrados por Ruiz-Marin e Mendoza-Espinosa, (2010) e em linhas gerais houve eficiências semelhantes de remoção de DQO, NH_4^+ , NTK e fósforo total, contudo, *S. obliquus* apresentou percentuais ligeiramente mais elevados que as outras espécies para os parâmetros - NTK e fósforo total.

Na Tabela 25 estão apresentados os resultados da análise de conteúdo e percentual de óleo das três espécies cultivadas nesta etapa do experimento. O cultivo autotrófico apresentou maiores percentuais de óleo por grama de biomassa e a espécie *D. subspicatus* destacou, apresentando maior acúmulo de óleo nas células.

Tabela 25 - Percentual de óleo de *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* com metabolismos autotrófico e mixotrófico e inóculos iniciais de 5%, 10%, 20%, 30%, 40% e 50% e efluente pós-UASB.

Percentual de óleo (%)		Percentual de óleo (%)
Autotrófico		Mixotrófico
5% <i>D. subspicatus</i>	30%	26%
10% <i>D. subspicatus</i>	18%	19%
20% <i>D. subspicatus</i>	21%	20%
30% <i>D. subspicatus</i>	21%	19%
40% <i>D. subspicatus</i>	20%	20%
50% <i>D. subspicatus</i>	31%	26%
5% <i>S. obliquus</i>	20%	18%
10% <i>S. obliquus</i>	20%	18%
20% <i>S. obliquus</i>	19%	17%
30% <i>S. obliquus</i>	17%	16%
40% <i>S. obliquus</i>	18%	15%
50% <i>S. obliquus</i>	19%	19%
5% <i>C. vulgaris</i>	23%	22%
10% <i>C. vulgaris</i>	26%	25%
20% <i>C. vulgaris</i>	30%	28%
30% <i>C. vulgaris</i>	22%	20%
40% <i>C. vulgaris</i>	25%	23%
50% <i>C. vulgaris</i>	29%	21%

Fonte: A Autora, 2016.

Converti et al. (2009) avaliam o conteúdo lipídico de *Nannochloropsis oculata* e *Chlorella vulgaris* para produção de biodiesel testando os efeitos em decorrência da mudança de temperatura. Com a temperatura 25 °C, o conteúdo lipídico de *N. oculata* foi de 14,92%. A espécie *C. vulgaris* com a temperatura de 25° C apresentou o conteúdo lipídico de 14,71%, porém, quando testado o aumento da temperatura para 30°C, o conteúdo teve uma diminuição para 5,90%. Por outro lado, uma redução de 75% da concentração de nitrogênio no meio, com relação aos valores ótimos para o crescimento, aumentou o percentual de *N. oculata* de 7,90% a 15,31% e de *C. vulgaris* de 5,90 a 16,41%, respectivamente.

Os percentuais de lipídios obtidos no presente trabalho foram superiores aos valores encontrados na pesquisa supracitada. Os valores de temperatura da presente pesquisa foram mantidos em 25°, coincidindo com os valores onde foram detectados os valores máximos de acumulação lipídica do estudo citado. Em relação à concentração de nitrogênio amoniacal, houve redução significativa da concentração nos primeiros sete dias de cultivo e análise realizada no 15º no cultivo autotrófico, demonstrou que o NH_4^+ tinha sido completamente exaurido do meio de cultivo, ou seja, houve estresse nutricional para as três espécies cultivadas e isso pode ter acarretado maior acumulação lipídica.

Arbib et al. (2014) estudou o uso das espécies *S. obliquus*, *Chlorella vulgaris*, *Chlorella Kessleri* cultivadas em metabolismo mixotrófico (14 horas com luz e 10 horas sem luz) em águas residuárias domésticas e sintéticas com utilização de 5% CO_2 e encontrou os seguintes percentuais de lipídios totais: *Chlorella vulgaris*- 22% com efluente doméstico e 21,75% com efluente sintético; *Chlorella Kessleri*- 20,5% com efluente doméstico e 19,2% com efluente sintético e *Scenedesmus obliquus*- 19,4% com efluente doméstico e 18,5% com efluente sintético. Comparando com os resultados do presente estudo, foram obtidos resultados de acúmulo lipídico superiores, principalmente com a utilização da espécie *D. subspicatus* no metabolismo autotrófico.

Park et al. (2011) estudaram 14 espécies com metabolismos autotróficos e mixotróficos para avaliar o potencial de aplicação para remediação de efluentes provenientes de estações de tratamento com nível secundário e para produção de biodiesel. Os cultivos mixotróficos foram suplementados com glicerol. A espécie *Scenedesmus sp.* apresentou percentual de lipídios totais entre 11-12%.

Comparando os resultados do presente trabalho com as pesquisas supracitadas, é possível constatar que o percentual de acumulação lipídica foi inferior ao resultado obtido por Liang, Sarkany E Cui (2009) no cultivo autotrófico da espécie *Chlorella vulgaris*, porém, foram superiores aos resultados obtidos por Park et al. (2010) no cultivo da espécie *Scenedesmus sp.*

5.4 ETAPA- 4 REMOÇÃO DE NUTRIENTES, MATÉRIA ORGÂNICA E PRODUÇÃO LIPÍDICA UTILIZANDO AS ESPÉCIES *D. SUBSPICATUS*, *S. OBLIQUUS* E *C. VULGARIS*, SUSPENSAS E IMOBILIZADAS EM EFLUENTES PÓS-UASB E PÓS-FAS

Para realização da etapa 4 do experimento foi utilizada a espécie *Desmodesmus subspicatus*, *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella vulgaris* cultivadas de forma suspensa e imobilizada utilizando o efluente pós-UASB e pós filtro biológico aerado submerso, com metabolismo autotrófico.

5.4.1 Crescimento de *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris*, em efluentes pós- UASB e pós-FAS

O esgoto doméstico pós-UASB e pós-FAS, que foram utilizados para o cultivo, foram analisados quanto aos parâmetros físico-químicos e os resultados estão apresentados na Tabela 26.

Tabela 26- Características físico-químicas do esgoto doméstico pós-UASB e pós-FAS utilizado para o cultivo das microalgas.

	DQO (mg.L⁻¹)	N-amoniacoal (mg.L⁻¹)	NTK (mg.L⁻¹)	Fósforo Total (mg.L⁻¹)
Pós- UASB	121,0	6,5	8,1	7,5
Pós- FAS	36,0	6,3	7,0	6,5

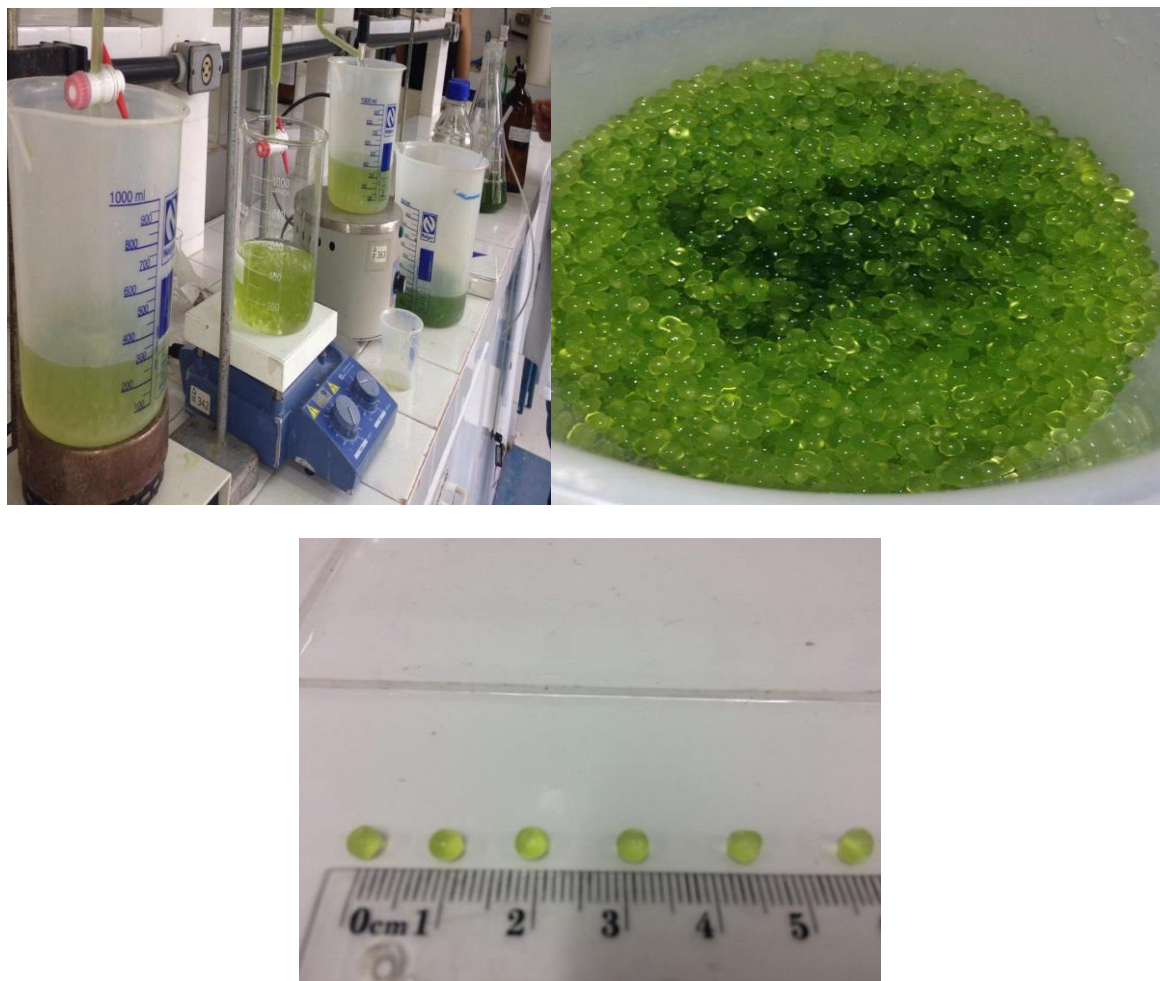
Fonte: A Autora, 2017.

O experimento foi realizado de forma contínua, utilizando as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus*, *C. vulgaris* em efluentes pós-UASB e pós-FAS. Nesta etapa da pesquisa, apenas o metabolismo autotrófico foi avaliado, contudo, foi avaliado o desenvolvimento dos cultivos com células de microalgas suspensas e imobilizadas. Na montagem do experimento foi realizada a contagem das células de microalgas e utilizou-se a densidade média de $8,5 \times 10^5$ cel/mL⁻¹ para o cultivo das células suspensa e a mesma densidade média foi utilizada para o cultivo com as microalgas imobilizadas. Sendo assim, neste experimento, foram avaliadas 12 variáveis, utilizando 24 frascos de vidro, já que este procedimento foi realizado em duplicata.

O objetivo desta fase do experimento foi avaliar de forma comparativa a utilização de células suspensas e imobilizadas, a remoção de matéria orgânica e de nutrientes e a produção lipídica. Foi realizado o acompanhamento da densidade celular, porém, estes resultados não

serão considerados no presente estudo. Na Figura 50 estão demonstradas imagens das algas imobilizadas utilizadas no cultivo.

Figura 50 - Algas imobilizadas utilizadas no cultivo



Fonte: A Autora, 2018

5.4.2 Avaliação da remoção de matéria orgânica e nutrientes dos efluentes pós-UASB e pós-FAS após o cultivo com células suspensas e imobilizadas

A remoção de DQO foi avaliada no esgoto pós-UASB e pós-FAS no 1º, 3º, 6º, 10º e 15º dia de cultivo utilizando as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus*, *C. vulgaris*, com as células suspensas e imobilizadas.

Avaliando os resultados de remoção de DQO no efluente pós-UASB (Figura 51) durante o experimento pôde-se perceber que houve redução da concentração, principalmente na análise após o 1º dia de cultivo e assim é possível apontar que o consumo da matéria orgânica ocorre rapidamente. Não houve diferença significativa na comparação entre os resultados de remoção

de DQO, comparando as células suspensas e imobilizadas para três espécies utilizadas. Na Figura 52 estão apresentados os resultados de remoção de DQO do efluente pós-FAS. Foi possível verificar um aumento da concentração de DQO, principalmente a partir do 10º dia de cultivo e com as espécies *D. subspicatus* e *C. vulgaris*. Provavelmente em decorrência da diminuição da densidade celular a partir 10º dia de cultivo devido à mortalidade das células, ou em decorrência de erros no procedimento de separação da biomassa e do líquido para execução da análise.

Figura 51 - Remoção de DQO do esgoto pós-UASB utilizado para o cultivo das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas.

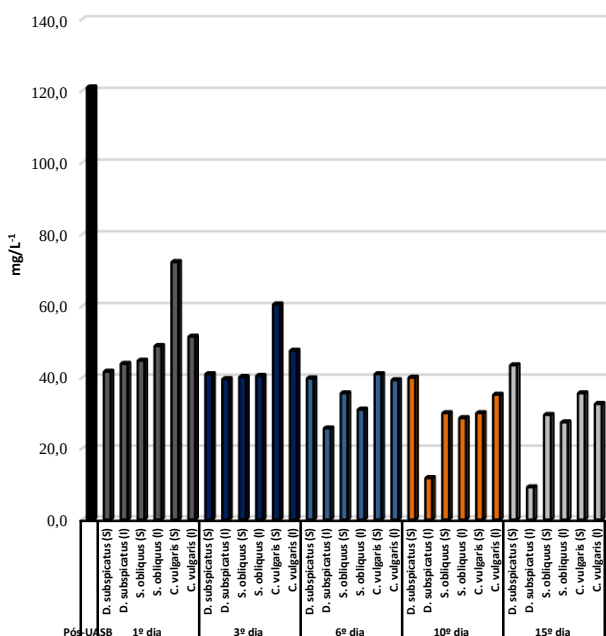
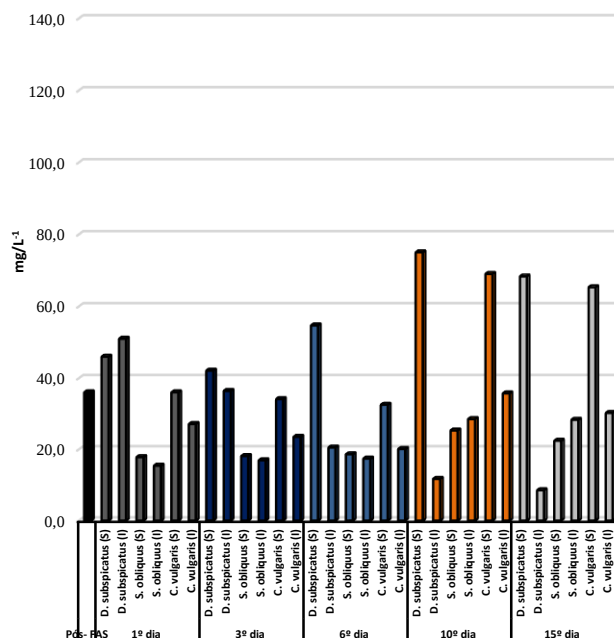


Figura 52 - Remoção de DQO do esgoto pós-FAS utilizado para o cultivo das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas.



Na Figura 53 estão apresentados os resultados de remoção de NH_4^+ do esgoto pós-UASBe a partir do 10º dia de cultivo já foi possível identificar uma concentração muito baixa ou mesmo a remoção de 100% do nutriente, como ocorreu na a espécie *D. subspicatus* (células suspensas e imobilizadas) e na *S. obliquus* (imobilizada). No 15º dia de cultivo a eficiência de remoção de 100% para todas as espécies utilizadas, com células suspensas ou imobilizadas. Na Figura 54 estão apresentados os resultados de remoção de NH_4^+ com cultivo em efluente pós-FAS e também houve a remoção total a partir do 10º dia de cultivo, exceto no experimento utilizando *S. obliquus* imobilizada. É importante salientar que as concentrações tanto do efluente pós-UASB, quanto do pós-FAS foram baixas e similares (6,5 e 6,3 mg/L⁻¹ respectivamente) para estes dois pontos de coleta utilizados.

Figura 53- Remoção de NH_4^+ utilizando o esgoto pós-UASB para o cultivo das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas(S) e imobilizadas (I).

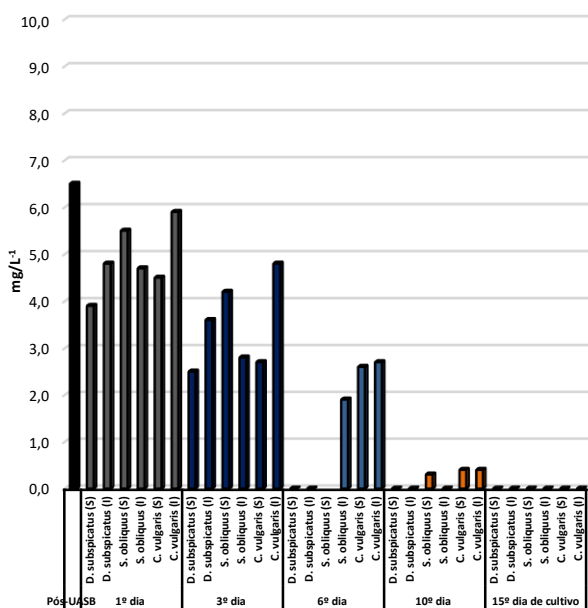
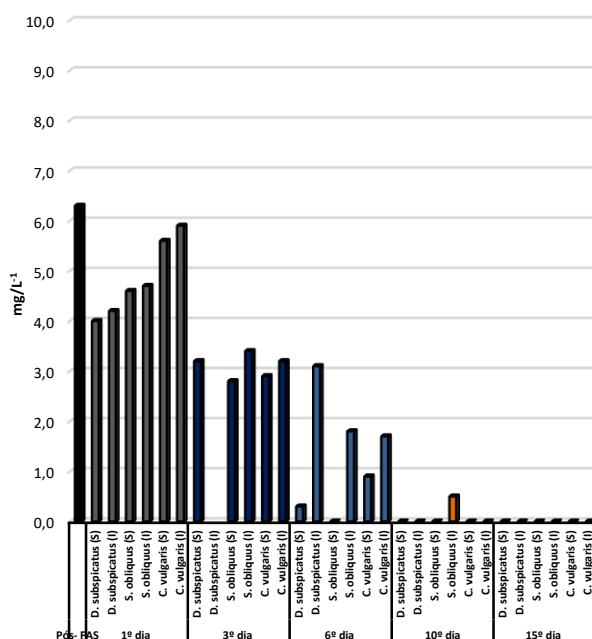


Figura 54- Remoção de NH_4^+ utilizando o esgoto pós-FAS para o cultivo das espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas(S) e imobilizadas (I).



Zhang et al.(2008), estudaram a remoção de nitrogênio amoniacal e ortofosfato utilizando a espécie *Scenedesmus sp.* imobilizada para uso no tratamento terciário. Foram testadas algumas variáveis como a concentração celular para produção das lâminas de microalgas imobilizadas, também foi testada diferentes espessuras das lâminas e a densidade das células no biorreator. Uma remoção completa de N-NH_4^+ e P-PO_4^{3-} , foram alcançadas dentro de 4 h de tratamento em biorreatores paralelos com a densidade celular na mistura de algas ($2 \times 10^8 \text{ cel/ mL}^{-1}$) e lâminas de gel de 3 mm após o segundo ciclo. Nove ciclos de tratamento de águas residuárias em 21 dias foram realizados e a maior eficiência de remoção NH_4^+ em foi de 99,1% após 105 min, 100% após 135 min, PO_4^{3-} . A eficiência de remoção de P foi de 100% após 15 min em efluentes secundários domésticos. O estudo concluiu que *Scenedesmus sp.* Imobilizado tem grande potencialidade para a remoção de nitrogênio inorgânico e fósforo de efluentes tratados. O presente estudo também observou que há aplicabilidade das células das três espécies de forma imobilizada na forma de “beds” para remoção de nutrientes, principalmente para remoção de NH_4^+ , contudo, o tempo para remoção dos compostos foi bem superior quando comparado a presente pesquisa e não foram testadas outras formas de imobilização das células, como através de lâminas, por exemplo. Sendo assim,

podem ser pesquisadas este tipo de imobilização, já que Zang et al., (2008) obtiveram resultados bastantes promissores, inclusive para reutilização das lâminas de microalgas.

Ruiz-Marin e Mendoza-Espinosa (2010) avaliaram de forma comparativa as espécies *C. vulgaris* e *S. obliquus* crescendo como células imobilizadas e livres e foram testadas a capacidade de remoção N e P em águas residuárias domésticas. A remoção de N-NH_4^+ pela espécie *S. obliquus* com células suspensas cultivadas em esgoto artificial e esgoto doméstico foi de 100% e com células imobilizadas a remoção foi e 95,4% e 96,6%, respectivamente, enquanto *C. vulgaris* com células suspensas, removeu 73,3% e 60,1%, e com células imobilizadas, 65,6% e 80%, respectivamente. Comparando com os resultados de remoção de N e P obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que a espécie *S. obliquus* suspensa foi mais eficiente em remover N-NH_4^+ , já que no 6º dia de cultivo o nutriente já havia sido exaurido do cultivo.

Nas Figuras 55 e 56 estão apresentados os resultados de remoção de NTK com esgoto pós-UASB e que foram realizados apenas no 3º e 15º dias de cultivo das espécies suspensas e imobilizadas. As maiores eficiências de remoção foram verificadas para as espécies *D. subspicatus* e *C. vulgaris* suspensas.

Figura 55 - Remoção de NTK utilizando o esgoto pós-UASB, com as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas(S) e imobilizadas (I).

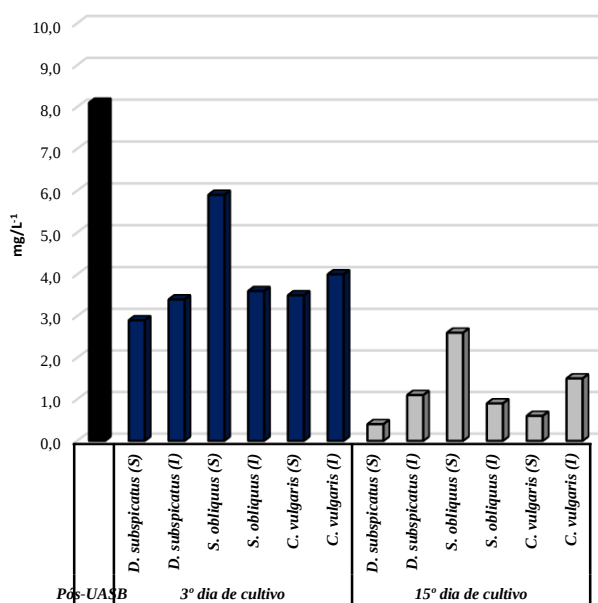
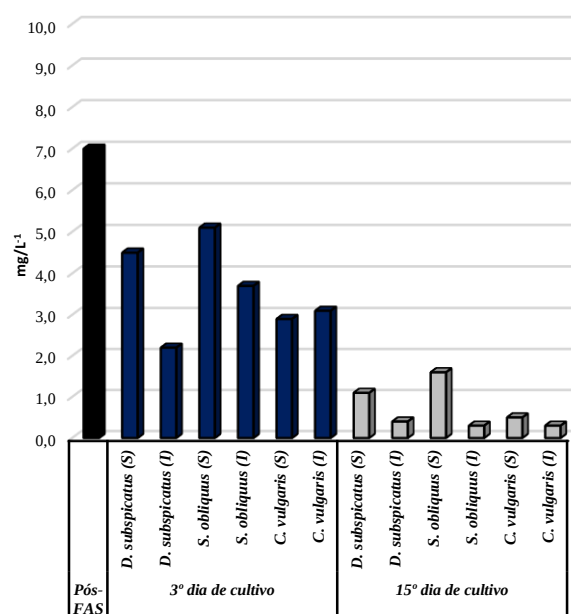


Figura 56 - Remoção de NTK utilizando o esgoto pós-FAS, com as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas(S) e imobilizadas (I).



Houve elevada absorção/conversão de NTK nos experimentos, tanto das espécies com células suspensas, quanto imobilizadas. É importante salientar que as concentrações de NTK do efluente utilizado como meio de cultivo foram baixas, pós-UASB- 8,0 mg/L⁻¹ e pós-FAS 7,1 mg/L⁻¹.

Na Figura 57 estão apresentados os resultados de remoção de fósforo total para o cultivo com esgoto pós-UASB. No 15º dia de cultivo a remoção foi quase que completa para a espécie *S. obliquus* (S e I) e na espécie *D. subspicatus* houve remoção completa para o cultivo com células imobilizadas. Na Figura 58 estão os dados de fósforo total utilizando o efluente pós-FAS, demonstrando que houve maiores percentuais de remoção para as espécies *D. subspicatus* e *S. obliquus* e com células suspensas, com 96,8% e 95,2% de eficiência, respectivamente.

Figura 57 - Remoção de fósforo total com esgoto pós-uasb utilizado para o cultivo com as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas.

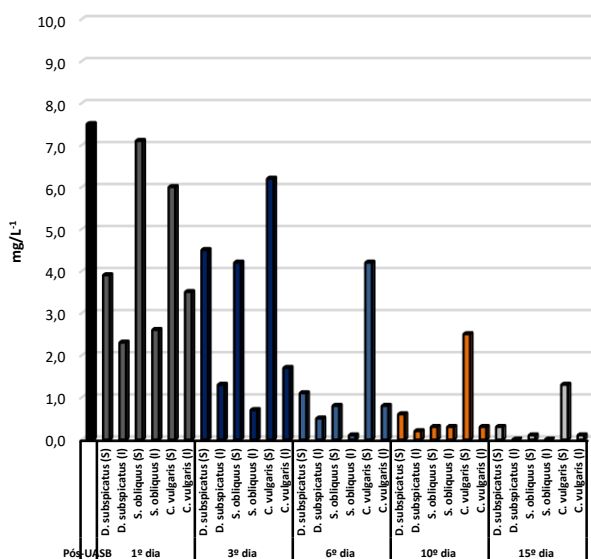
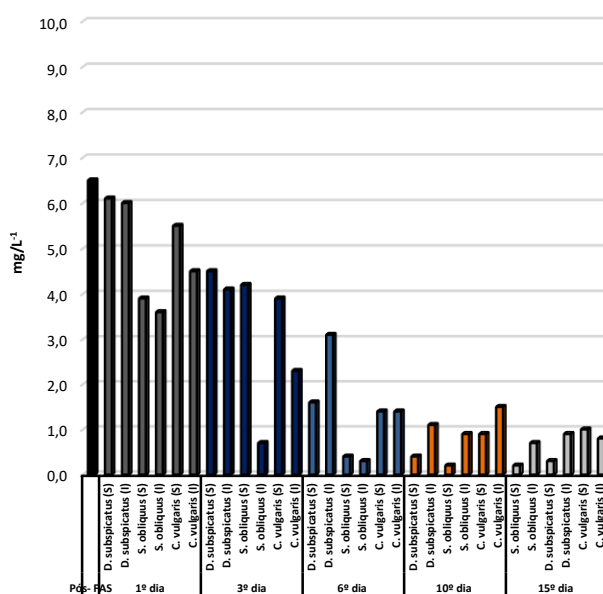


Figura 26 - Remoção de fósforo total com pós-fas utilizado para o cultivo com as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas.



Ruiz-Marine Mendoza-Espinosa (2010) avaliaram de forma comparativa as espécies *Chlorella vulgaris* e *S. obliquus* crescendo como células imobilizadas e livres e foram testadas a capacidade de remoção N e P em águas residuárias domésticas. A remoção de N-NH₄⁺ pela espécie *S. obliquus* com células suspensas cultivadas em esgoto artificial e esgoto doméstico foi de 100% e com células imobilizadas a remoção foi e 95,4% e 96,6%, respectivamente,

enquanto *C. vulgaris* com células suspensas, removeu 73,3% e 60,1%, e com células imobilizadas, 65,6% e 80%, respectivamente.

Comparando com os resultados de remoção de N e P obtidos no presente trabalho, pode-se afirmar que a espécie *S.obliquus* suspensa foi mais eficiente em remover N-NH_4^+ já que no 6º dia de cultivo o nutriente já havia sido exaurido do cultivo e nas outras espécies também houve remoção total de, no 10º e 15º dia de cultivo, tanto as células suspensas como as imobilizadas.

5.4.3 Percentual de óleo das espécies *D. subspicatus* e *S.obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas em efluente pós-UASB e pós-FAS

Na Tabela 27 estão apresentados os resultados de conteúdo e percentual de óleo dos experimentos. A espécie *D. subspicatus* apresentou bastante levado, inclusive muito superior aos dos experimentos da etapa 1, 2 e 3 deste estudo. Estes resultados podem estar relacionados com as baixas concentrações de nitrogênio e fósforo que foram evidenciadas nos efluentes utilizados neste experimento e antes mesmo do 6º dia de cultivo já estava ocorrendo estresse nutricional, o que pode ter contribuído para o maior acúmulo lipídico. É importante destacar o desempenho da espécie *D.subspicatus* no acúmulo de óleo que foi superior as outras espécies testadas e também ressaltar que existem poucos estudos utilizando este gênero, já que recentemente que os estudos taxonômicos foram conclusivos para diferenciar o gênero *Desmodemus*, do gênero *Scenedesmus*. Sendo assim, é importante a investigação da sua aplicabilidade em cultivos com efluente domésticos e também com efluentes industriais para remoção de matéria orgânica, nutrientes e produção lipídica. As espécies com cultivos suspensos obtiveram maior acúmulo lipídico e os cultivos com algas imobilizadas apresentaram percentuais inferiores de acumulação.

Poucos estudos científicos foram realizados para verificar a aplicabilidade de microalgas imobilizadas para produção lipídica e geração de biodiesel, a maioria das pesquisas são voltadas para tratamento de efluentes. Sendo assim, os resultados da presente pesquisa foram importantes para geração de conhecimento e avaliação da viabilidade do processo.

Tabela 27 - Conteúdo e percentual de óleo da espécie *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* suspensas e imobilizadas com o metabolismo autotrófico.

Percentual de óleo (%)	
Pós-UASB	
<i>D. subspicatus</i> suspensa	42%
<i>D. subspicatus</i> imobilizada	27%
<i>S. obliquus</i> suspensa	43%
<i>S. obliquus</i> imobilizada	20%
<i>C. vulgaris</i> suspensa	24%
<i>C. vulgaris</i> imobilizada	21%
Pós-FAS	
<i>D. subspicatus</i> suspensa	47%
<i>D. subspicatus</i> imobilizada	15%
<i>S. obliquus</i> suspensa	45%
<i>S. obliquus</i> imobilizada	24%
<i>C. vulgaris</i> suspensa	26%
<i>C. vulgaris</i> suspensa	22%

De-Bashan et al. (2002), estudaram a possibilidade de incremento do conteúdo lipídico através do crescimento de células imobilizadas em “beads” de alginato comparando com a imobilização conjunta de *Chlorella spp.* e a bactéria *Azospirillum brasilense*. O estudo comprovou que houve um aumento do conteúdo lipídico e no número de ácidos graxos na imobilização utilizando a bactéria, indicando *Azospirillum brasilense* induziu mudanças significativas no metabolismo das microalgas. Na presente pesquisa não foram realizados testes utilizando consócio de microalgas e bactérias imobilizadas e diante dos resultados promissores apresentados por De-Bashan et al. (2002), pode ser algo a ser aplicado em pesquisas futuras.

5.4.4 Identificação e Quantificação dos FAME's

Foi também realizada a quantificação dos ácidos graxos e os mais abundantes encontrados na espécie *D. subspicatus* com células suspensas e imobilizadas e cultivadas com efluente pós-UASB e pós-FAS, estão demonstrados nas Figuras 59 e 60, respectivamente.

Figura 59 - Quantificação de FAME's da espécie *D. subspicatus* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.

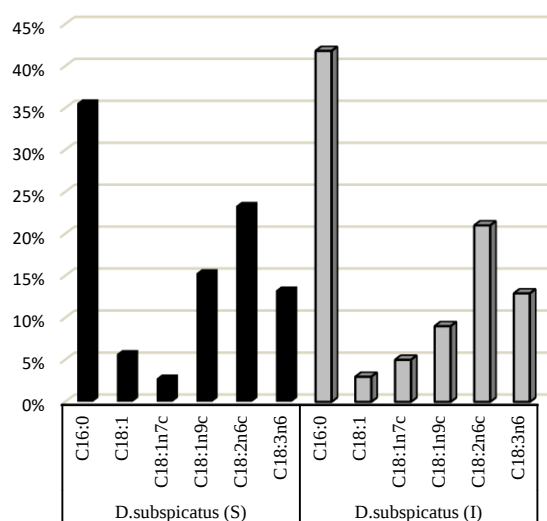
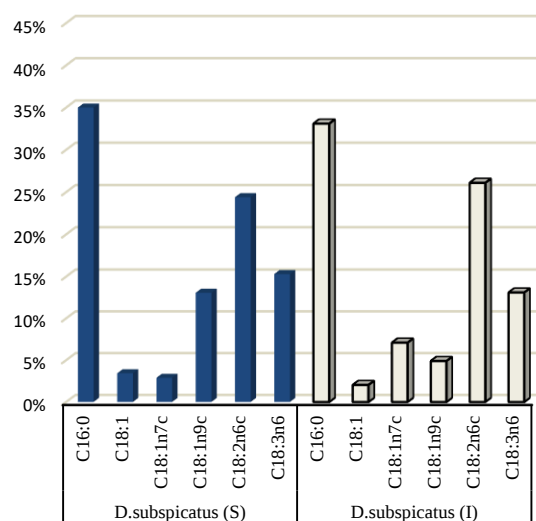


Figura 60 - Quantificação de FAME's da espécie *D. subspicatus* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.



Nas Figuras 61 e 62 estão os ácidos graxos que foram identificados na espécie *S. obliquus* com os cultivos em células suspensas e imobilizadas, respectivamente.

Figura 61 - Quantificação de FAME's da espécie *S. obliquus* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.

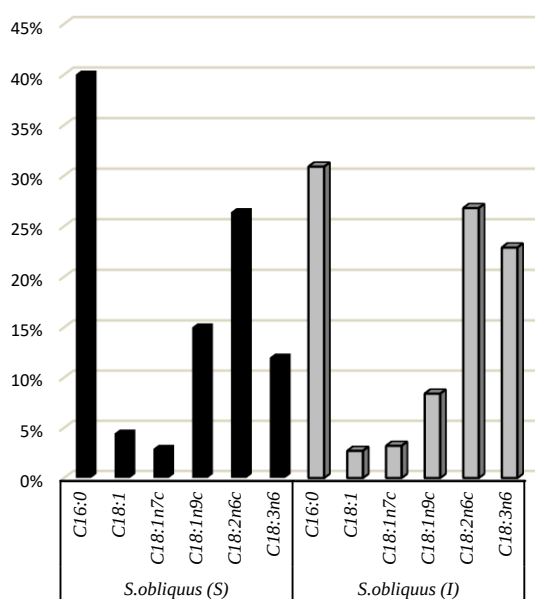
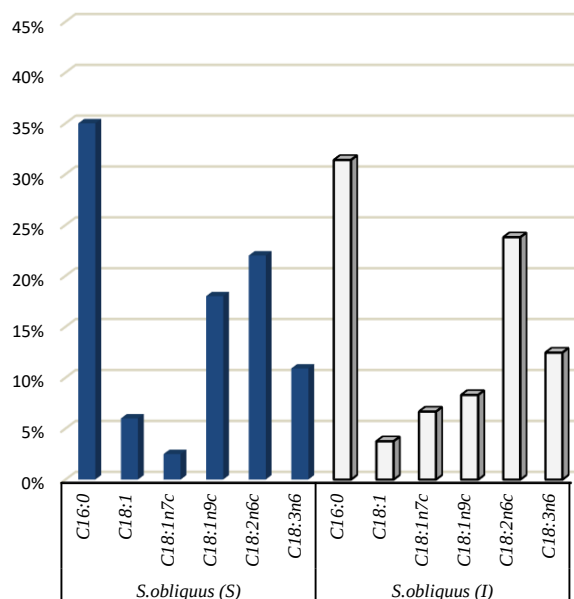


Figura 62 - Quantificação de FAME's da espécie *S. obliquus* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.



Nas Figuras 63 e 64 estão apresentados os resultados de FAME's da espécie *Chlorella vulgaris*, com células suspensas e imobilizadas, respectivamente.

Figura 63 - Quantificação de FAME's da espécie *C. vulgaris* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-UASB.

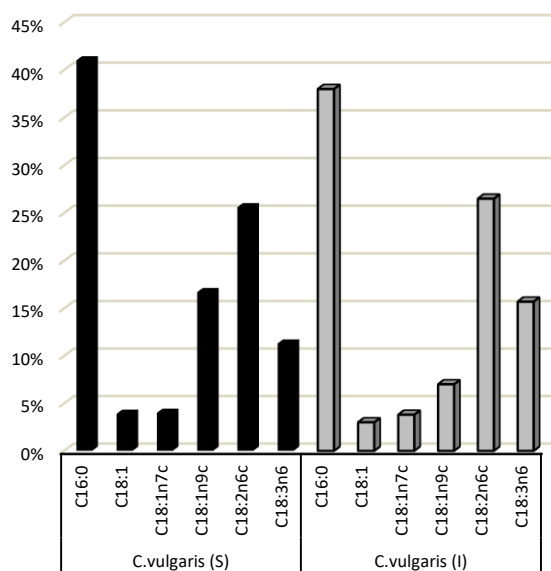
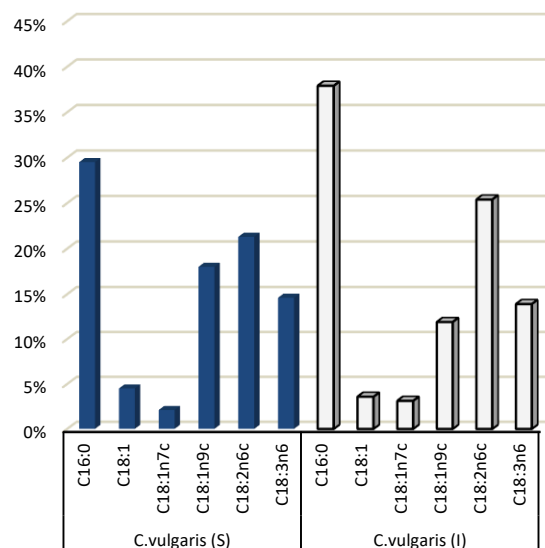


Figura 64 - Quantificação de FAME's da espécie *C. vulgaris* suspensa(S) e imobilizada (I) com efluente pós-FAS.



Pôde-se perceber que os ácidos graxos que apresentaram-se em maior abundância identificados nas três espécies, foram: C:16 a C:18 - o ácido palmítico (16:01), ácido esteárico (18:1), ácido cis vacênico(18:1n7c), ácido oleico (18:1n9c), ácido linoleico (18:2n6c), metil linolenato (18:3n6).

Segundo Aakanksha (2010), a composição do ácido graxo de uma célula de microalga é afetada por diferentes fatores, porém em condições normais, a composição de ácidos graxos é determinada pela constituição genética da célula de algas. Em situação adversa, o lipídio algal se torna dependente dos fatores ambientais, esses fatores podem ser químicos ou físicos. Os aspectos químicos que afetam a composição lipídica pode ser a deficiência de nutrientes, salinidade e pH do meio. Entre os fatores físicos que afetam a composição lipídica estão a intensidade e a temperatura da luz. Junto com estes estímulos químicos e físicos, as fases de crescimento afetam a composição de ácidos graxos. Durante a deficiência de nitrogênio, por exemplo, o acúmulo de triglicerídios começa a aumentar.

A qualidade lipídica é uma questão importante para a produção de biodiesel, como o teor de alquil éster dita a estabilidade edesempenho do combustível, e isso é um importantefator

para atender aos padrões internacionais de combustível, a “mistura ideal” de ácidos graxos foi sugerida como sendo 16:1, 18:0 e 14:0 na proporção 5: 4: 1. Esse biodiesel teria as propriedades de baixo potencial oxidativo, mantendo um bom CFPP (ponto de entupimento de filtro a frio) classificação e número de cetano.

Samorì et al. (2013) avaliaram a espécie *Desmodesmus communis*, crescendo em metabolismo autotrófico e mixotrófico e cultivadas em efluente doméstico e artificial e os ácidos graxos mais abundantes foram ácido palmítico, ácidos oléico cis e oléico trans com um percentual relativo de 24,5%, 22,4% e 20,4%. Na presente pesquisa, *D. subspcitus* também apresentaram maior percentual do ácido palmítico (C16:0), porém o ácido cis linoleico apresentou a segundo maior porcentagem.

Na pesquisa de Ho et al. (2010), os grupos de ácidos graxos C16 / C18 atingiram 89% do total de ácidos graxos, de acordo com o observado em *Scenedemus obliquus* quando cultivado em meio deficiente em nutrientes e os resultados foram semelhantes aos encontrados na presente pesquisa. Yoo et al. (2010) estudaram a produção lipídica com utilização de CO₂ e verificou que a espécie *Chlorella vulgaris* produziu os seguintes ácidos graxos: C16:0 – 24%, C16:01- 2,1% C18- 1,3%, C18:1 -24,8% e C18:2- 47,8%. Os experimentos de *Chlorella vulgaris* da presente pesquisa também encontraram os ácidos graxos de C:16 a C:18.

6 CONCLUSÕES

Etapa 1: Avaliação do crescimento da espécie *D. subspicatus* em efluente pós-DS com e sem filtração

- O pré-tratamento do efluente através da filtração não reduziu a ação de microrganismos predadores e também não trouxe resultados positivos de aumento da densidade em decorrência da diminuição da turbidez da água e aumentada transmitância da luz.
- Na maioria dos experimentos, não houve diferenças estatísticas entre as concentrações iniciais que foram testadas, ou seja, esse parâmetro não foi significativo para o crescimento das microalgas, contudo, em relação ao percentual lipídico, os cultivos com concentrações iniciais mais elevadas (40% e 50%) apresentaram valores mais elevados;
- Os cultivos mixotróficos apresentaram maiores taxas de crescimento, quando houve a comparação com os cultivos autotróficos e principalmente quando comparados aos cultivos heterotróficos, que não teve crescimento exponencial, o que pode estar relacionado à falta de uma fonte de carbono orgânica que não foi suprida pelos compostos existentes no efluente. Sendo assim, a espécie *D. subspicatus* tem potencial para crescer mixotroficamente, reduzindo os custos de produção em cultivos de larga escala;
- Em relação às remoções de nutrientes e matéria orgânica do efluente pós-DS, as eficiências foram elevadas, principalmente na remoção de NH_4^+ em que houve, na maioria dos experimentos com metabolismos autotrófico e mixotrófico, a remoção de 100% do nutriente, ao final do cultivo. Esta alta remoção também pode estar relacionada aos elevados valores médios de pH dos cultivos.

Etapa 2: Avaliação do crescimento da espécie *D. subspicatus* em efluente pós-FAS com e sem autoclavagem

- A autoclavagem do efluente foi eficaz para reduzir os microrganismos predadores do cultivo, contudo, não trouxe benefícios para elevação da densidade celular, nem para a acumulação lipídica, na maioria dos experimentos. Provavelmente, as bactérias heterotróficas presentes nos efluentes têm uma relação mutualística positiva com algumas espécies de microalgas, principalmente no metabolismo autotrófico, onde há a disponibilização de CO_2 pelas bactérias para uso na fotossíntese das microalgas;
- A espécie *D. subspicatus* se adaptou ao efluente e pós-FAS utilizado para o cultivo e apresentou DCM_{ax} altas (10^7 cel/mL), nos cultivos autotróficos e mixotróficos, como

também altas eficiências de remoção de NH_4^+ , NTK e fósforo total. A remoção de DQO não foi elevada em nenhum dos experimentos, provavelmente em decorrência da concentração do efluente utilizado como meio de cultivo;

- As maiores taxas de crescimento foram identificadas nos cultivos mixotróficos, porém os resultados de percentual lipídico foram superiores para os cultivos autotróficos e que provavelmente estão relacionados com o estresse nutricional que reduz a densidade celular, contudo, favorece a estocagem de uma maior quantidade de lipídios totais por grama de biomassa;
- O cultivo heterotrófico também não apresentou um bom desenvolvimento no efluente pós-FAS e tanto a densidade celular como o acúmulo de óleo, foram bem inferiores aos dos metabolismos autotróficos e heterotróficos;

Etapa 3: Avaliação do crescimento da espécie *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris* em efluente pós-UASB

- O cultivo mixotrófico da espécie *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris*, foi eficaz para o acúmulo lipídico, pois, as células das microalgas realizavam a fotossíntese na fase clara e o consumo de compostos orgânicos na fase escura e provavelmente, não sofreram fotoinibição, como é comum ocorrer nos cultivos autotróficos. Sendo assim, é necessária a realização de mais testes em escalas maiores, através de cultivos em fotobiorreatores, por exemplo, para tratamento terciário de efluentes e aumentar a produtividade de óleo.
- Quando comparadas as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris*, não houve diferença estatísticas entre as densidades celulares, contudo, em relação à acumulação lipídica as espécies *C. vulgaris* e *D. subspicatus* se destacaram.
- Nos cultivos onde ocorreu estresse de nutrientes, principalmente quando o nitrogênio amoniacal foi exaurido durante os primeiros 7º dias de cultivo, houve maior acúmulo de óleo e em contrapartida, houve redução da densidade celular.

Etapas 4: Remoção de nutrientes, matéria orgânica e produção lipídica utilizando as espécies *D. subspicatus*, *S. obliquus* e *C. vulgaris*, suspensas e imobilizadas em efluente pós-UASB e pós-FAS.

- A imobilização das células das três espécies de microalgas não gerou percentuais de eficiência de remoção de nutrientes e matéria orgânica mais elevadas quando comparadas as células suspensas e apresentou conteúdo de óleo inferior, provavelmente, devido a dificuldade de difusão dos compostos para o interior da imobilização;
- Houve maior acúmulo de lipídios na espécie *D. subspicatus* suspensas, chegando a um percentual de 43% e este resultado pode ter sido influenciado pela baixa concentração de nitrogênio e fósforo nos efluentes que foram utilizados como meio de cultivo e o estresse nutricional foi iniciado antes mesmo do 6 ° dia de cultivo;
- A identificação e quantificação de FAMES demonstrou que as espécies tanto suspensas quanto imobilizadas apresentaram o perfil lipídico com os ácidos graxos C16-C:18.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-RAOUF, N.; AL-HOMAIDAN, A.A.; IBRAHEEM, I.B.M. Microalgae and wastewater treatment. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Saudi Arabia, v. 19, n. 3, p.257-275, jul. 2012.
- ADAMS, C. et al. Understanding precision nitrogen stress to optimize the growth and lipid content tradeoff in oleaginous green microalgae. **Bioresource Technology**, v. 131, p.188-194, mar. 2013.
- AAKANKSHA, R. et al. Diversity of lipids in algae. **Lake 2010: Wetlands, Biodiversity and Climate Change**, p.1-9, 2010.
- ALABI, A. O.; TAMPIER, M.; BIBEAU, E. Microalgae technologies & processes for biofuel/bioenergy production in british columbia. **Seed Science**,[s.l.],p. 88, jan. 2009.
- ANGELO, E. A.; ANDRADE, D. S.; COLOZZI FILHO, A. Cultivo não-fotoautotrófico de microalgas: uma visão geral. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 35, n. 2, p.125-136, 5 fev. 2014.
- APHA, AWWA; WEF. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 19 ed.American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, Washington D.C, 1995.
- ARBIB, Z. et al. Capability of different microalgae species for phytoremediation processes: Wastewater tertiary treatment, CO₂ bio-fixation and low cost biofuels production. **Water Research**, [s.l.], v. 49, p.465-474, fev. 2014.
- ASLAN, S.; KAPDAN, I. K. Batch kinetics of nitrogen and phosphorus removal from synthetic wastewater by algae. **Ecological Engineering**, Turkey, v. 28, n. 1, p.64-70, nov. 2006.
- AZEREDO, V. B. S. **Produção de Biodiesel a partir do cultivo de microalgas: estimativa de custos e perspectivas para o Brasil**. Dissertação (Mestrado em Planejamento Energético) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.
- AZMA, M. et al. Improvement of médium composition for heterotrophic Cultivation of green microalgae. *Tetraselmis suecica*, using response surfasse methodology. **Biochemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 53, n. 2, p.187-195, jan. 2011.
- BARROS, A. I. et al. Harvesting techniques applied to microalgae: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 41, p.1489-1500, jan. 2015.
- BARSANTI, L.; GUALTIERI, P. **Algae: Anatomy, Biochemistry and Biotechnology**, 2. ed. USA: CRC Press, 2006.
- BECKER, E.W. **Microalgae: biotechnology and microbiology**. Cambridge studies in biotechnology. Cambridge: Cambridge University Press; 239p., 1994.

BEER, L.L. et al. Engineering algae for biohydrogen and biofuel production. **Current Opinion in Biotechnology**, [s.l.], v. 20, n. 3, p.264-271, jun. 2009.

BEEVI, U. S.; SUKUMARAN, R. Cultivation of microalgae in dairy effluent for oil production and removal of organic pollution load. **Bioresource Technology**, Essex, v. 165, p. 295–301, 2014.

BHATNAGAR, A. et al. *Chlorella minutissima*—A Promising Fuel Alga for Cultivation in Municipal Wastewaters. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 161, n. 1-8, p.523-536, 1 nov. 2009.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, [s.l.], v. 37, n. 8, p.911-917, ago. 1959.

BONINI, M. D. A.; BASTOS, R. G. Produção de biomassa de *Aphanothece microscopica* e *Chlorella vulgaris* por cultivo heterotrófico a partir de glicose. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 151-160, 2012.

BOROWITZKA, M. A. Fats, oils and hydrocarbons. In: BOROWITZKA, M. A.; BOROWITZKA, L. J. **Micro-Algal Biotechnology**. Cambridge University Press: Cambridge, UK, 1988.

BRENNAN, L. OWENDE, P. Biodiesel from microalgae. A review of technologies for production, processing, and extractions of biodiesel and co-products. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.l.], v. 14, n. 2, p. 557-577, 2010.

BUMBAK, F. et al. Best practices in heterotrophic high-cell-density microalgal processes: achievements, potential and possible limitations. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s.l.], v. 91, n. 1, p.31-46, mai. 2011.

CAI, T. et al. Comparison of *Synechocystis* sp. PCC6803 and *Nannochloropsis salina* for lipid production using artificial seawater and nutrients from anaerobic digestion effluent. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 144, p.255-260, set. 2013.

CALLEGARI-JACQUES S. M. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed Editora, 2003. 264 p.

CANOVAS, S. et al. Seasonal development of phytoplankton and zooplankton in a high-rate algal pond. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 33, n. 7, p.199-206, 1996.

CLARENS, A. F. et al. Environmental Life Cycle Comparison of Algae to Other Bioenergy Feedstocks. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 44, n. 5, p.1813-1819, mar. 2010.

CHEN, C. et al. Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: A critical review. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, n. 1, p.71-81, jan. 2011.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.294-306, maio 2007.

CHISTI, Y. Biodiesel from microalgae beats bioethanol. **Trends in Biotechnology**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.126-131, mar. 2008.

CONVERTI, A. et al. Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.1146-1151, jun. 2009.

CÓRDOBA, L. T. et al. Batch culture growth of *Chlorella zofingiensis* on effluent derived from two-stage anaerobic digestion of two-phase olive mill solid waste. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 11, n. 2, p. 1-8, 2008.

CRAGGS, R. Advanced integrated wastewater ponds. In: SHILTON, A. (Ed.). **Pond Treatment Technology**. Londres: IWA Publishing, p.282–310. 2005a.

CRAGGS, R. Energy from wastewater treatment. **Water Atmosphere**, [s.l.], v.13, n.4, 2005b.

CUELLAR-BERMUDEZ, S.P. et al. Nutrient's utilization and contaminants removal: a review of two approaches of algae and cyanobacteria in wastewater. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p. 438-449. 2016.

DARLEY, W. M., **Algal Biology: A Physiological Approach**. Basic Microbiology. Oxford, UK: Blackwell Scientific Publications, 1982. 168 p.

DAY, J. G.; GONG, Y.; HU, Q. Microzooplanktonic grazers: a potentially devastating threat to the commercial success of microalgal mass culture. **Algal Research**, [s.l.], v. 27, p.356-365, nov. 2017.

DE-BASHAN, L. et al. Increased pigment and lipid content, lipid variety, and cell and population size of the microalgae *Chlorella spp.* when co-immobilized in alginate beads with the microalgae-growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. **Canadian Journal of Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 6, p.514-521, jun. 2002.

DEMIRBAS, M. F. Biofuels from algae for sustainable development. **Applied Energy**, [s.l.], v. 88, p.3473–3480. 2011.

EGAN, P. F.; TRAINOR, F.R. The role of unicells in the polymorphic *Scenedesmus armatus* (Chlorophyceae)1. **Journal of Phycology**, [s.l.], v. 25, n. 1, p.65-70, mar. 1989.

ERIKSEN, N. The technology of microalgal culturing. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 30, n.9, p.1525-1536, 2008.

EROGLU, E; SMITH, S.M.; RASTON, C.L. Application of Various Immobilization Techniques for Algal Bioprocesses. **Biofuel and Biorefinery Technologies**, [s.l.], p.19-44, 2015.

FOGG, G. E., **Algal Cultures and Phytoplankton Ecology**, 2 ed. Wisconsin: The University of Wisconsin Press, 1975. 175 p.

FRANCHINO, M. et al. Growth of three microalgae strains and nutrient removal from an agro-zootechnical digestate. **Chemosphere**, [s.l.], v. 92, n. 6, p.738-744, jul. 2013.

FRANCO, A. L. C. et al. Biodiesel de microalgas: avanços e desafios. **Química Nova**, Brasil, v. 36, n. 3, p.437-448, 2013.

GIRARD, J.M. et al. Mixotrophic cultivation of green microalgae *Scenedesmus obliquus* on cheese whey permeate for biodiesel production. **Algal Research**, Oxford, v. 5, n. 7, p. 241-248, 2014.

GONÇALVES, A. L.; PIRES, J. C. M.; SIMÕES, M. A review on the use of microalgal consortia for wastewater treatment. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p.403-415, jun. 2017.

GREENWELL, H. C. et al. Placing microalgae on the biofuels priority list: a review of the technological challenges. **Journal of the royal society Interface**, [s.l.], v. 7, n. 46, p.703-726, mai. 2010.

GRESSLER, P. et al. Cultivation of *Desmodesmus subspicatus* in a tubular photobioreactor for bioremediation and microalgae oil production. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 35, n. 2, p.209-219, ago. 2013.

GRIMA, M. et al. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 20, n. 7-8, p.491-515, jan. 2003.

GROBBELAAR, J. U.; SOEDER, C. J. **Respiration losses in planktonic green algae cultivated in raceway ponds**. 1985. Disponível em:
<<https://academic.oup.com/plankt/articleabstract/7/4/497/1403279redirectedFromfulltext>>.
Acesso em: 27 set. 2015.

GUTIÉRREZ, R. et al. Harvesting microalgae from wastewater treatment systems with natural flocculants: Effect on biomass settling and biogas production. **Algal Research**, [s.l.], v. 9, p.204-211, maio 2015.

HAKALIN, N. L. S. **Otimização das condições de cultivo da microalga *Scenedesmus* sp. para a produção de biodiesel**. 2014. 155 f. Tese (Doutorado em Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

HALIM, R.; WEBLEY, P. A. Extraction of oil from microalgae for biodiesel production: a review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 30, n. 3, p.709-732, maio 2012.

HAMEED, M.; EBRAHIM, O. Biotechnological potential uses of immobilized algae. **International Journal of Agriculture and Biology** [s.l.], v.9, p.183-192, 2007.

HARUN, R.; DANQUAH, M.K. Enzymatic hydrolysis of microalgae biomass for bioethanol production. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, p. 1079-1084, 2011.

- HE, S.; XUE, G. Algal-based immobilization process to treat the effluent from a secondary wastewater treatment plant (WWTP). **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 178, n. 1-3, p.895-899, jun. 2010
- HEREDIA-ARROYO, T.; WEI, W.; HU, B.. Oil Accumulation via Heterotrophic/Mixotrophic *Chlorella protothecoides*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 162, n.7, p. 1978–1995, nov. 2010.
- HU, Q. Industrial Production of Microalgal Cell-Mass and Secondary Products - Major Industrial Species: *Arthrospira (Spirulina) Platensis*. In: RICHMOND, A. **Handbook of Microalgal Culture: biotechnology and applied phycology**, [s.l.]: Blackwell Publishing, 2004. p.264-272.
- HU, G. et al. Microalgal triacylglycerols as feedstocks for biofuel production: perspectives and advances. **The Plant Journal**, [s.l.], v.54, p.621-639, 2008.
- HUANG, G.; CHEN, F.; WEI, D. Biodiesel production by microalgal biotechnology. **Applied Energy**, [s.l.], v. 87, p. 38–46, 2010.
- HUANG, Y., et al. Botanical pesticides as potential rotifer-control agents in microalgal mass culture. **Algal Research**, [s.l.], v. 4, p.62-69, abr. 2014.
- INDARTI, E. et al. Direct FAME synthesis for rapid total lipid analysis from fish oil and cod liver oil. **Journal of Food Composition and Analysis**, [s.l.], v. 18, n. 2-3, p.161-170, mar. 2005.
- Jl, F. et al. Biomass production and nutrients removal by a new microalgae strain *Desmodesmus* sp. in anaerobic digestion wastewater. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 161, p.200-207, jun. 2014.
- KIM, J. et al. Removal of ammonia from wastewater effluent by *Chlorella vulgaris*. **Tsinghua Science and Technology**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.391-396, ago. 2010.
- KHOTIMCHENKO, S; YAKOVLEVA, I. Lipid composition of the red alga exposed to different levels of photon irradiance. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.73-79, jan. 2005.
- KONG, Q. et al. Culture of Microalgae *Chlamydomonas reinhardtii* in Wastewater for Biomass Feedstock Production. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, [s.l.], v. 160, n. 1, p.9-18, 9 jun. 2009.
- LAU, P. S.; TAM, N.f. Y.; WONG, Y. S. Wastewater Nutrients Removal by *Chlorella Vulgaris*: Optimization Through Acclimation. **Environmental Technology**, [s.l.], v. 17, n. 2, p.183-189, fev. 1996.
- LEE, R.E. **Phycology**. 4 ed. New York: Cambridge University Press, 2008.547 p.
- LI, X.; XU, H.; WU, Q. Large-scale biodiesel production from microalga *Chlorella protothecoides* through heterotrophic cultivation in bioreactors. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v. 98, n. 4, p. 764-771, 2007.

- LI, Y. et al. Effect of light intensity on algal biomass accumulation and biodiesel production for mixotrophic strains *Chlorella kessleri* and *Chlorella protothecoide* cultivated in highly concentrated municipal wastewater. **Biotechnology and Bioengineering**, Berkeley, v. 109, n. 9, p.2222-2229, mar. 2012.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y. Biomass and lipid productivities of *Chlorella vulgaris* under autotrophic, heterotrophic and mixotrophic growth conditions. **Biotechnology Letters**, [s.l.], v. 31, n. 7, p.1043-1049, mar. 2009.
- LIANG, Y.; SARKANY, N.; CUI, Y.; BLACKBURN, J. Batch stage study of lipid production from crude glycerol derived from yellow grease or animal fats through microalgal fermentation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 101, n. 17, p. 6745-6750, 2010.
- LOURENÇO, S. **O cultivo de microalgas marinhas: princípios e aplicações**. 1ª ed. São Paulo: Roma, 2006. 606 p.
- LUO, Y.; LE-CLECH, P.; HENDERSON, R. K. Simultaneous microalgae cultivation and wastewater treatment in submerged membrane photobioreactors: a review. **Algal Research**, [s.l.], v. 24, p.425-437, jun. 2017.
- MAGRO, F. G. et al. Produção de Bioetanol Utilizando Microalgas: uma Revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 37, n. 1, p.159-174, mar. 2016.
- MALLICK, N. Biotechnological potential of immobilized algae for wastewater N, P and metal removal: a review. **Biometals**, [s.l.], v. 15, n. 4, p.377-390, 2002.
- MARA, D.D., PEARSON, H., Artificial freshwater environment: waste stabilization ponds. In: REHM, H.-J., REED, G. (Eds.), **Biotechnology**, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, v. 8, p.177-206, 1986.
- MARKOU, G.; GEORGAKAKIS, D. Cultivation of filamentous cyanobacteria (blue-green algae) in agro-industrial wastes and wastewaters: a review. **Applied Energy**, Västerås, v. 88, n. 7, p. 3401-3389, 2011.
- MASSERET, E. et al. Effects of a Waste Stabilization Lagoon Discharge on Bacterial and Phytoplanktonic Communities of a Stream. **Water Environment Research**, [s.l.], v. 72, n. 3, p.285-294, maio 2000.
- MATA, T. M.; MARTINS, A. A.; CAETANO, N. S. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 14, p.217-232, 2010.
- MEZZOMO, N. et al. Cultivation of microalgae *Spirulina platensis* (*Arthrospira platensis*) from biological treatment of swine wastewater. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 1, p. 173-178, 2010.
- MIAO, X.; WU, Q. High yield bio-oil production from fast pyrolysis by metabolic controlling of *Chlorella protothecoides*. **Journal of Biotechnology**, [s.l.], v. 110, n.1, p.85-93, 2004.

MIAO, X.; WU, Q. Biodiesel production from heterotrophic microalgal oil. **Bioresource Technology**, v. 97, p.841-846, 2006

MOLINA, E. et al. Tubular photobioreactor desing for algal cultures. **Journal of Biotechnology**. [s.1], v.92, p.113-131, 2001.

MORAIS, M.G.; COSTA, J.A.V. Fatty acids profile of microalgae cultivated with carbon dioxide, **Ciência e Agrotecnologia.**, v. 32, n.4, p. 1245–1251, 2008.

MUTHURAJ, M. et al. Evaluation of indigenous microalgal isolate *Chlorella* sp. FC2 IITG as a cell factory for biodiesel production and scale up in outdoor conditions. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, Heidelberg, v. 41, n. 3, p. 499- 511, 2014.

NELSON, D.L.; COX, M.M.**Princípios de bioquímica de Lehninger**.5 ed.Porto Alegre: Artmed, 2011.

O'GRADY, J. E; MORGAN, J.A. Heterotrophic growth and lipid production of *Chlorella protothecoides* on glycerol. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, vol.34, p. 121–125, 2011.

PAIVA, M.V.C. **Avaliação da comunidade fitoplanctônica e eficiência de um sistema de tratamento de esgotos no litoral de Pernambuco**.2012. 141 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil e Ambiental) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

PALABHANVI, B.; KUMAR, V.; MUTHURAJ, M.; DAS, D. Preferential utilization of intracellular nutrients supports microalgal growth under nutrient starvation: multi-nutrient mechanistic model and experimental validation. **Bioresource Technology**, Essex, v. 173, n. 2, p. 245-255, 2014.

PAN, Y.Y. et al. Isolation of thermo-tolerant and high lipid content green microalgae: Oil accumulation is predominantly controlled by photosystem efficiency during stress treatments in *Desmodesmus*. **Bioresource Technology**, v. 102, n.22, p. 10510-10517, 2011.

PARK, J. B. K.; CRAGGS, R. J. Wastewater treatment and algal production in high rate algal ponds with carbon dioxide addition. **Water Science and Technology**, [s.l.], v. 61, n. 3, p.633-639, fev. 2010.

PARK, J.B.K. et al. Ammonia removal from anaerobic digestion effluent of livestock waste using green alga *Scenedesmus* sp. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 22, p.8649-8657, nov. 2010.

PARK, K.C. et al. Mixotrophic and photoautotrophic cultivation of 14 microalgae isolates from Saskatchewan, Canada: potential applications for wastewater remediation for biofuel production. **Journal of Applied Phycology**, [s.l.], v. 24, n. 3, p.339-348, 24 dez. 2011.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Efficiency of growth and nutrient uptake from wastewater by heterotrophic, autotrophic, and mixotrophic cultivation of *Chlorella vulgaris* immobilized with *Azospirillum brasilense*. **Journal Phycology**, [s.1.], v. 46, p.800-812. 2010.

PEREZ-GARCIA, O. et al. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. **Water Research**, [s.l.], v. 45, n. 1, p.11-36, jan. 2011.

PERRINE, Z.; NEGI, S.; SAYRE, R. T. Optimization of photosynthetic light energy utilization by microalgae. **Algal Research**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.134-142, out. 2012.

PIRES, J.C.M. et al. Wastewater treatment to enhance the economic viability of microalgae culture. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 20, n. 8, p.5096-5105, mai. 2013.

PITTMAN, J.K.; DEAN, A.P.; OSUNDEKO, O. The potential of sustainable algal biofuel production using wastewater resources, **BioresourceTechnology**, v. 102, p.17–25, 2011.

PRAGYA, N.; PANDEY, K.K.; SAHOO, P.K. A review on harvesting, oil extraction and biofuels production Technologies from microalgae. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, [s.1], v. 24, p. 159-171, aug. 2013.

PULZ, O. Photobioreactors: production systems for phototrophic microorganisms. **Applied. Microbiol. Biotechnol**, [s.1.], v. 57, p.287-293, 2001.

RAI, L.C.; GOUR, J.P.; KUMAR, H.D.; Phycology and heavy metal pollution. **Biological Reviews**, v. 56, p.99–151, 1981.

REDALJE, D.G. et al. Algae as ideal waste removers: biochemical pathways. In: HUNTLEY, M.E. (Ed.). **Biotreatment of Agricultural Wastewater**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 91–110.

RUIZ-MARIN, A.; MENDOZA-ESPINOSA, L. G.; S.T. Growth and nutrient removal in free and immobilized green algae in batch and semi-continuous cultures treating real wastewater. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.58-64, jan. 2010.

SAMORÌ, G. et al. Growth and nitrogen removal capacity of *Desmodesmus communis* and of a natural microalgae consortium in a batch culture system in view of urban wastewater treatment: Part I. **Water Research**, [s.l.], v. 47, n. 2, p.791-801, fev. 2013.

SCOTT, S. A.; DAVEY, M. P.; DENNIS, J. S. Diesel from algae: challenges and prospects. **Biotechnology**. [s.l.], v.21, p.277-286, 2010.

TALBOT, P.; DE LA NOÏE, J. Tertiary treatment of wastewater with *Phormidium Bohneri* (Schmidle) under various light and temperature conditions. **Water Research**, [s.1.], v.27, n.1, p.153-9. 1993.

TANG, D.; HAN, W.; LI, P.; MIAO, X.; ZHONG, J. CO₂ Fixation and fatty acid composition of *Scenedesmus obliquus* and *Chorella pyrenoidosa* in response to different CO₂ levels. **Bioresource Technology**, [s.1.], v. 102, p. 3071-3076, 2011.

TRAINOR, F.R. Cyclomorphosis in *Scenedesmus armatus* (Chlorophyta): na ordered sequence of ecomorph development. **Journal of Phycology**, [s.1.], v. 28, p. 552-558, 1992.

TRAVIESO, L.; BENITEZ, F.; DUPEIRON, R. Sewage treatment using immobilized microalgae. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 40, n. 2, p.183-187, jan. 1992.

UNNITHAN, V.V.; UNC, A.; SMITH, G.B. Role of *Nannochloropsis salina* for the recovery and persistence of MS2 virus in wastewater. **Algal Research**, [s.l.], v. 4, p.70-75, abr. 2014.

WANG, L. et al. Cultivation of green algae *Chlorella sp.* in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. [s.l.], v. 162, n.4, p.1174–1186, 2010.

WANG, J.; YANG, H.; WANG, F. Mixotrophic cultivation of microalgae for biodiesel production: status and prospects. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Heidelberg, v. 172, n. 7, p. 3307-3329, 2014.

WILHELM, C. et al. The Regulation of Carbon and Nutrient Assimilation in Diatoms is Significantly Different from Green Algae. **Protist**, [s.l.], v. 157, n. 2, p.91-124, jun. 2006.

WOERTZ, I. et al. Algae Grown on Dairy and Municipal Wastewater for Simultaneous Nutrient Removal and Lipid Production for Biofuel Feedstock. **Journal of Environmental Engineering**, [s.l.], v. 135, n. 11, p.1115-1122, nov. 2009.

XIN, L. et al. Effects of different nitrogen and phosphorus concentrations on the growth, nutrient uptake, and lipid accumulation of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* **Bioresource Technology**, [s.l.], v.101,p. 5494-5500, 2010.

XIN, L.; HONG-YING, H.; YU-PING, Z. Growth and lipid accumulation properties of a freshwater microalga *Scenedesmus sp.* under different cultivation temperature. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 102, p. 3098–3102, 2011.

YEH, K.; CHANG, J. Effects of cultivation conditions and media composition on cell growth and lipid productivity of indigenous microalga *Chlorella vulgaris* ESP-31. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 105, p.120-127, fev. 2012.

YOO, Chan et al. Selection of microalgae for lipid production under high levels carbon dioxide. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 101, n. 1, p.71-74, jan. 2010.

ZHANG, E. et al. Ammonia–nitrogen and orthophosphate removal by immobilized *Scenedesmus sp.* isolated from municipal wastewater for potential use in tertiary treatment. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 99, n. 9, p.3787-3793, jun. 2008.

ZHAO, G. et al. The effect of different trophic modes on lipid accumulation of *Scenedesmus quadricauda*. **Bioresource Technology**, [s.l.], v. 114, p.466-471, jun. 2012.

ZHOU, X. P. et al. Evaluation of oil-producing algae as potential biodiesel feedstock. **Bioresource Technology**. [s.l.], v. 134, p.24-29. 2013.

ANEXO A – RESULTADOS DAS ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Dunn's multiple comparisons test	Mean rank diff,	Significant?	Summary	
5% autoclavado autotrofico vs. 5% autoclavado mixotrofico	269,1	Yes	***	A-B
5% autoclavado autotrofico vs. 5% autoclavado heterotrofico	342	Yes	****	A-C
5% autoclavado autotrofico vs. 5% autotrofico	90,13	No	ns	A-D
5% autoclavado autotrofico vs. 5% mixotrofico	80,2	No	ns	A-E
5% autoclavado autotrofico vs. 5% heterotrofico	349,5	Yes	****	A-F
5% autoclavado autotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	68,77	No	ns	A-G
5% autoclavado autotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	69,03	No	ns	A-H
5% autoclavado autotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	293,8	Yes	****	A-I
5% autoclavado autotrofico vs. 10%autotrofico	49	No	ns	A-J
5% autoclavado autotrofico vs. 10%mixotrofico	70,8	No	ns	A-K
5% autoclavado autotrofico vs. 10% heterotrofico	284,4	Yes	***	A-L
5% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	80,63	No	ns	A-M
5% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	75,8	No	ns	A-N
5% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	275,6	Yes	***	A-O
5% autoclavado autotrofico vs. 20% autotrofico	55,97	No	ns	A-P
5% autoclavado autotrofico vs. 20% mixotrofico	68,13	No	ns	A-Q
5% autoclavado autotrofico vs. 20% heterotrofico	237,7	Yes	*	A-R
5% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	266,4	Yes	***	A-S
5% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	269,1	Yes	***	A-T
5% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	374	Yes	****	A-U
5% autoclavado autotrofico vs. 30% autotrofico	-58,13	No	ns	A-V
5% autoclavado autotrofico vs. 30% mixotrofico	-9,2	No	ns	A-W
5% autoclavado autotrofico vs. 30% heterotrofico	217,1	No	ns	A-X
5% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	15,3	No	ns	A-Y
5% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	278,8	Yes	***	A-Z
5% autoclavado autotrofico vs. 40% autotrofico	-42,57	No	ns	A-AB
5% autoclavado autotrofico vs. 40% mixotrofico	-21,7	No	ns	A-AC
5% autoclavado autotrofico vs. 40% heterotrofico	181,1	No	ns	A-AD
5% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-33,07	No	ns	A-AE
5% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	2,533	No	ns	A-AF
5% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	75,17	No	ns	A-AG
5% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-66	No	ns	A-AH
5% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	-28,87	No	ns	A-AI
5% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	125,5	No	ns	A-AJ
5% autoclavado mixotrofico vs. 5% autoclavado heterotrofico	72,9	No	ns	B-C
5% autoclavado mixotrofico vs. 5% autotrofico	-179	No	ns	B-D
5% autoclavado mixotrofico vs. 5% mixotrofico	-188,9	No	ns	B-E
5% autoclavado mixotrofico vs. 5% heterotrofico	80,33	No	ns	B-F
5% autoclavado mixotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	-200,4	No	ns	B-G
5% autoclavado mixotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	-200,1	No	ns	B-H
5% autoclavado mixotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	24,63	No	ns	B-I
5% autoclavado mixotrofico vs. 10%autotrofico	-220,1	Yes	*	B-J
5% autoclavado mixotrofico vs. 10%mixotrofico	-198,3	No	ns	B-K
5% autoclavado mixotrofico vs. 10% heterotrofico	15,27	No	ns	B-L
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-188,5	No	ns	B-M
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-193,3	No	ns	B-N
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	6,5	No	ns	B-O
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% autotrofico	-213,2	No	ns	B-P
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% mixotrofico	-201	No	ns	B-Q
5% autoclavado mixotrofico vs. 20% heterotrofico	-31,47	No	ns	B-R
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-2,7	No	ns	B-S
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	0	No	ns	B-T
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	104,9	No	ns	B-U
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% autotrofico	-327,3	Yes	****	B-V
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-278,3	Yes	***	B-W
5% autoclavado mixotrofico vs. 30% heterotrofico	-52	No	ns	B-X
5% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-253,8	Yes	**	B-Y
5% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	9,7	No	ns	B-Z
5% autoclavado mixotrofico vs. 40% autotrofico	-311,7	Yes	****	B-AB

5% autoclavado mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-290,8	Yes	****	B-AC
5% autoclavado mixotrofico vs. 40% heterotrofico	-88	No	ns	B-AD
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-302,2	Yes	****	B-AE
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-266,6	Yes	***	B-AF
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-194	No	ns	B-AG
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-335,1	Yes	****	B-AH
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-298	Yes	****	B-AI
5% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	-143,7	No	ns	B-AJ
5% autoclavado heterotrofico vs. 5% autotrofico	-251,9	Yes	**	C-D
5% autoclavado heterotrofico vs. 5% mixotrofico	-261,8	Yes	**	C-E
5% autoclavado heterotrofico vs. 5% heterotrofico	7,433	No	ns	C-F
5% autoclavado heterotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	-273,3	Yes	***	C-G
5% autoclavado heterotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	-273	Yes	***	C-H
5% autoclavado heterotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	-48,27	No	ns	C-I
5% autoclavado heterotrofico vs. 10%autotrofico	-293	Yes	****	C-J
5% autoclavado heterotrofico vs. 10%mixotrofico	-271,2	Yes	***	C-K
5% autoclavado heterotrofico vs. 10% heterotrofico	-57,63	No	ns	C-L
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-261,4	Yes	**	C-M
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-266,2	Yes	***	C-N
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	-66,4	No	ns	C-O
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% autotrofico	-286,1	Yes	***	C-P
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% mixotrofico	-273,9	Yes	***	C-Q
5% autoclavado heterotrofico vs. 20% heterotrofico	-104,4	No	ns	C-R
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-75,6	No	ns	C-S
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	-72,9	No	ns	C-T
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	31,97	No	ns	C-U
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% autotrofico	-400,2	Yes	****	C-V
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-351,2	Yes	****	C-W
5% autoclavado heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-124,9	No	ns	C-X
5% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-326,7	Yes	****	C-Y
5% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	-63,2	No	ns	C-Z
5% autoclavado heterotrofico vs. 40% autotrofico	-384,6	Yes	****	C-AB
5% autoclavado heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-363,7	Yes	****	C-AC
5% autoclavado heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-160,9	No	ns	C-AD
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-375,1	Yes	****	C-AE
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-339,5	Yes	****	C-AF
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-266,9	Yes	***	C-AG
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% autotrofico	-408	Yes	****	C-AH
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-370,9	Yes	****	C-AI
5% autoclavado heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-216,6	No	ns	C-AJ
5% autotrofico vs. 5% mixotrofico	-9,933	No	ns	D-E
5% autotrofico vs. 5% heterotrofico	259,3	Yes	**	D-F
5% autotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	-21,37	No	ns	D-G
5% autotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	-21,1	No	ns	D-H
5% autotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	203,6	No	ns	D-I
5% autotrofico vs. 10%autotrofico	-41,13	No	ns	D-J
5% autotrofico vs. 10%mixotrofico	-19,33	No	ns	D-K
5% autotrofico vs. 10% heterotrofico	194,3	No	ns	D-L
5% autotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-9,5	No	ns	D-M
5% autotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-14,33	No	ns	D-N
5% autotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	185,5	No	ns	D-O
5% autotrofico vs. 20% autotrofico	-34,17	No	ns	D-P
5% autotrofico vs. 20% mixotrofico	-22	No	ns	D-Q
5% autotrofico vs. 20% heterotrofico	147,5	No	ns	D-R
5% autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	176,3	No	ns	D-S
5% autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	179	No	ns	D-T
5% autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	283,9	Yes	***	D-U
5% autotrofico vs. 30% autotrofico	-148,3	No	ns	D-V
5% autotrofico vs. 30% mixotrofico	-99,33	No	ns	D-W
5% autotrofico vs. 30% heterotrofico	127	No	ns	D-X
5% autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-74,83	No	ns	D-Y
5% autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	188,7	No	ns	D-Z
5% autotrofico vs. 40% autotrofico	-132,7	No	ns	D-AB
5% autotrofico vs. 40% mixotrofico	-111,8	No	ns	D-AC

5% autotrofico vs. 40% heterotrofico	91	No	ns	D-AD
5% autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-123,2	No	ns	D-AE
5% autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-87,6	No	ns	D-AF
5% autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-14,97	No	ns	D-AG
5% autotrofico vs. 50% autotrofico	-156,1	No	ns	D-AH
5% autotrofico vs. 50% mixotrofico	-119	No	ns	D-AI
5% autotrofico vs. 50% heterotrofico	35,33	No	ns	D-AJ
5% mixotrofico vs. 5% heterotrofico	269,3	Yes	***	E-F
5% mixotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	-11,43	No	ns	E-G
5% mixotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	-11,17	No	ns	E-H
5% mixotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	213,6	No	ns	E-I
5% mixotrofico vs. 10%autotrofico	-31,2	No	ns	E-J
5% mixotrofico vs. 10%mixotrofico	-9,4	No	ns	E-K
5% mixotrofico vs. 10% heterotrofico	204,2	No	ns	E-L
5% mixotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	0,4333	No	ns	E-M
5% mixotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-4,4	No	ns	E-N
5% mixotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	195,4	No	ns	E-O
5% mixotrofico vs. 20% autotrofico	-24,23	No	ns	E-P
5% mixotrofico vs. 20% mixotrofico	-12,07	No	ns	E-Q
5% mixotrofico vs. 20% heterotrofico	157,5	No	ns	E-R
5% mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	186,2	No	ns	E-S
5% mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	188,9	No	ns	E-T
5% mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	293,8	Yes	****	E-U
5% mixotrofico vs. 30% autotrofico	-138,3	No	ns	E-V
5% mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-89,4	No	ns	E-W
5% mixotrofico vs. 30% heterotrofico	136,9	No	ns	E-X
5% mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-64,9	No	ns	E-Y
5% mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	198,6	No	ns	E-Z
5% mixotrofico vs. 40% autotrofico	-122,8	No	ns	E-AB
5% mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-101,9	No	ns	E-AC
5% mixotrofico vs. 40% heterotrofico	100,9	No	ns	E-AD
5% mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-113,3	No	ns	E-AE
5% mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-77,67	No	ns	E-AF
5% mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-5,033	No	ns	E-AG
5% mixotrofico vs. 50% autotrofico	-146,2	No	ns	E-AH
5% mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-109,1	No	ns	E-AI
5% mixotrofico vs. 50% heterotrofico	45,27	No	ns	E-AJ
5% heterotrofico vs. 10% autoclavado autotrofico	-280,7	Yes	***	F-G
5% heterotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	-280,4	Yes	***	F-H
5% heterotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	-55,7	No	ns	F-I
5% heterotrofico vs. 10%autotrofico	-300,5	Yes	****	F-J
5% heterotrofico vs. 10%mixotrofico	-278,7	Yes	***	F-K
5% heterotrofico vs. 10% heterotrofico	-65,07	No	ns	F-L
5% heterotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-268,8	Yes	***	F-M
5% heterotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-273,7	Yes	***	F-N
5% heterotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	-73,83	No	ns	F-O
5% heterotrofico vs. 20% autotrofico	-293,5	Yes	****	F-P
5% heterotrofico vs. 20% mixotrofico	-281,3	Yes	***	F-Q
5% heterotrofico vs. 20% heterotrofico	-111,8	No	ns	F-R
5% heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-83,03	No	ns	F-S
5% heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	-80,33	No	ns	F-T
5% heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	24,53	No	ns	F-U
5% heterotrofico vs. 30% autotrofico	-407,6	Yes	****	F-V
5% heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-358,7	Yes	****	F-W
5% heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-132,3	No	ns	F-X
5% heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-334,2	Yes	****	F-Y
5% heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	-70,63	No	ns	F-Z
5% heterotrofico vs. 40% autotrofico	-392	Yes	****	F-AB
5% heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-371,2	Yes	****	F-AC
5% heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-168,3	No	ns	F-AD
5% heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-382,5	Yes	****	F-AE
5% heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-346,9	Yes	****	F-AF
5% heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-274,3	Yes	***	F-AG
5% heterotrofico vs. 50% autotrofico	-415,5	Yes	****	F-AH

5% heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-378,3	Yes	****	F-AI
5% heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-224	Yes	*	F-AJ
10% autoclavado autotrofico vs. 10% autoclavado mixotrofico	0,2667	No	ns	G-H
10% autoclavado autotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	225	Yes	*	G-I
10% autoclavado autotrofico vs. 10%autotrofico	-19,77	No	ns	G-J
10% autoclavado autotrofico vs. 10%mixotrofico	2,033	No	ns	G-K
10% autoclavado autotrofico vs. 10% heterotrofico	215,6	No	ns	G-L
10% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	11,87	No	ns	G-M
10% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	7,033	No	ns	G-N
10% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	206,9	No	ns	G-O
10% autoclavado autotrofico vs. 20% autotrofico	-12,8	No	ns	G-P
10% autoclavado autotrofico vs. 20% mixotrofico	-0,6333	No	ns	G-Q
10% autoclavado autotrofico vs. 20% heterotrofico	168,9	No	ns	G-R
10% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	197,7	No	ns	G-S
10% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	200,4	No	ns	G-T
10% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	305,2	Yes	****	G-U
10% autoclavado autotrofico vs. 30% autotrofico	-126,9	No	ns	G-V
10% autoclavado autotrofico vs. 30% mixotrofico	-77,97	No	ns	G-W
10% autoclavado autotrofico vs. 30% heterotrofico	148,4	No	ns	G-X
10% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-53,47	No	ns	G-Y
10% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	210,1	No	ns	G-Z
10% autoclavado autotrofico vs. 40% autotrofico	-111,3	No	ns	G-AB
10% autoclavado autotrofico vs. 40% mixotrofico	-90,47	No	ns	G-AC
10% autoclavado autotrofico vs. 40% heterotrofico	112,4	No	ns	G-AD
10% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-101,8	No	ns	G-AE
10% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-66,23	No	ns	G-AF
10% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	6,4	No	ns	G-AG
10% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-134,8	No	ns	G-AH
10% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	-97,63	No	ns	G-AI
10% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	56,7	No	ns	G-AJ
10% autoclavado mixotrofico vs. 10% autoclavado heterotrofico	224,7	Yes	*	H-I
10% autoclavado mixotrofico vs. 10%autotrofico	-20,03	No	ns	H-J
10% autoclavado mixotrofico vs. 10%mixotrofico	1,767	No	ns	H-K
10% autoclavado mixotrofico vs. 10% heterotrofico	215,4	No	ns	H-L
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	11,6	No	ns	H-M
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	6,767	No	ns	H-N
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	206,6	No	ns	H-O
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% autotrofico	-13,07	No	ns	H-P
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% mixotrofico	-0,9	No	ns	H-Q
10% autoclavado mixotrofico vs. 20% heterotrofico	168,6	No	ns	H-R
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	197,4	No	ns	H-S
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	200,1	No	ns	H-T
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	305	Yes	****	H-U
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% autotrofico	-127,2	No	ns	H-V
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-78,23	No	ns	H-W
10% autoclavado mixotrofico vs. 30% heterotrofico	148,1	No	ns	H-X
10% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-53,73	No	ns	H-Y
10% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	209,8	No	ns	H-Z
10% autoclavado mixotrofico vs. 40% autotrofico	-111,6	No	ns	H-AB
10% autoclavado mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-90,73	No	ns	H-AC
10% autoclavado mixotrofico vs. 40% heterotrofico	112,1	No	ns	H-AD
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-102,1	No	ns	H-AE
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-66,5	No	ns	H-AF
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	6,133	No	ns	H-AG
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-135	No	ns	H-AH
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-97,9	No	ns	H-AI
10% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	56,43	No	ns	H-AJ
10% autoclavado heterotrofico vs. 10%autotrofico	-244,8	Yes	**	I-J
10% autoclavado heterotrofico vs. 10%mixotrofico	-223	Yes	*	I-K
10% autoclavado heterotrofico vs. 10% heterotrofico	-9,367	No	ns	I-L
10% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-213,1	No	ns	I-M
10% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-218	Yes	*	I-N
10% autoclavado heterotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	-18,13	No	ns	I-O
10% autoclavado heterotrofico vs. 20% autotrofico	-237,8	Yes	*	I-P

10% autoclavado heterotrofico vs. 20% mixotrofico	-225,6	Yes	*	I-Q
10% autoclavado heterotrofico vs. 20% heterotrofico	-56,1	No	ns	I-R
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-27,33	No	ns	I-S
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	-24,63	No	ns	I-T
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	80,23	No	ns	I-U
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% autotrofico	-351,9	Yes	****	I-V
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-303	Yes	****	I-W
10% autoclavado heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-76,63	No	ns	I-X
10% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-278,5	Yes	***	I-Y
10% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	-14,93	No	ns	I-Z
10% autoclavado heterotrofico vs. 40% autotrofico	-336,3	Yes	****	I-AB
10% autoclavado heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-315,5	Yes	****	I-AC
10% autoclavado heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-112,6	No	ns	I-AD
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-326,8	Yes	****	I-AE
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-291,2	Yes	****	I-AF
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-218,6	Yes	*	I-AG
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% autotrofico	-359,8	Yes	****	I-AH
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-322,6	Yes	****	I-AI
10% autoclavado heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-168,3	No	ns	I-AJ
10%autotrofico vs. 10%mixotrofico	21,8	No	ns	J-K
10%autotrofico vs. 10% heterotrofico	235,4	Yes	*	J-L
10%autotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	31,63	No	ns	J-M
10%autotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	26,8	No	ns	J-N
10%autotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	226,6	Yes	*	J-O
10%autotrofico vs. 20% autotrofico	6,967	No	ns	J-P
10%autotrofico vs. 20% mixotrofico	19,13	No	ns	J-Q
10%autotrofico vs. 20% heterotrofico	188,7	No	ns	J-R
10%autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	217,4	No	ns	J-S
10%autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	220,1	Yes	*	J-T
10%autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	325	Yes	****	J-U
10%autotrofico vs. 30% autotrofico	-107,1	No	ns	J-V
10%autotrofico vs. 30% mixotrofico	-58,2	No	ns	J-W
10%autotrofico vs. 30% heterotrofico	168,1	No	ns	J-X
10%autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-33,7	No	ns	J-Y
10%autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	229,8	Yes	*	J-Z
10%autotrofico vs. 40% autotrofico	-91,57	No	ns	J-AB
10%autotrofico vs. 40% mixotrofico	-70,7	No	ns	J-AC
10%autotrofico vs. 40% heterotrofico	132,1	No	ns	J-AD
10%autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-82,07	No	ns	J-AE
10%autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-46,47	No	ns	J-AF
10%autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	26,17	No	ns	J-AG
10%autotrofico vs. 50% autotrofico	-115	No	ns	J-AH
10%autotrofico vs. 50% mixotrofico	-77,87	No	ns	J-AI
10%autotrofico vs. 50% heterotrofico	76,47	No	ns	J-AJ
10%mixotrofico vs. 10% heterotrofico	213,6	No	ns	K-L
10%mixotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	9,833	No	ns	K-M
10%mixotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	5	No	ns	K-N
10%mixotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	204,8	No	ns	K-O
10%mixotrofico vs. 20% autotrofico	-14,83	No	ns	K-P
10%mixotrofico vs. 20% mixotrofico	-2,667	No	ns	K-Q
10%mixotrofico vs. 20% heterotrofico	166,9	No	ns	K-R
10%mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	195,6	No	ns	K-S
10%mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	198,3	No	ns	K-T
10%mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	303,2	Yes	****	K-U
10%mixotrofico vs. 30% autotrofico	-128,9	No	ns	K-V
10%mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-80	No	ns	K-W
10%mixotrofico vs. 30% heterotrofico	146,3	No	ns	K-X
10%mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-55,5	No	ns	K-Y
10%mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	208	No	ns	K-Z
10%mixotrofico vs. 40% autotrofico	-113,4	No	ns	K-AB
10%mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-92,5	No	ns	K-AC
10%mixotrofico vs. 40% heterotrofico	110,3	No	ns	K-AD
10%mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-103,9	No	ns	K-AE
10%mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-68,27	No	ns	K-AF

10%mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	4,367	No	ns	K-AG
10%mixotrofico vs. 50% autotrofico	-136,8	No	ns	K-AH
10%mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-99,67	No	ns	K-AI
10%mixotrofico vs. 50% heterotrofico	54,67	No	ns	K-AJ
10% heterotrofico vs. 20% autoclavado autotrofico	-203,8	No	ns	L-M
10% heterotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-208,6	No	ns	L-N
10% heterotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	-8,767	No	ns	L-O
10% heterotrofico vs. 20% autotrofico	-228,4	Yes	*	L-P
10% heterotrofico vs. 20% mixotrofico	-216,3	No	ns	L-Q
10% heterotrofico vs. 20% heterotrofico	-46,73	No	ns	L-R
10% heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-17,97	No	ns	L-S
10% heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	-15,27	No	ns	L-T
10% heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	89,6	No	ns	L-U
10% heterotrofico vs. 30% autotrofico	-342,5	Yes	****	L-V
10% heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-293,6	Yes	****	L-W
10% heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-67,27	No	ns	L-X
10% heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-269,1	Yes	***	L-Y
10% heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	-5,567	No	ns	L-Z
10% heterotrofico vs. 40% autotrofico	-327	Yes	****	L-AB
10% heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-306,1	Yes	****	L-AC
10% heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-103,3	No	ns	L-AD
10% heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-317,5	Yes	****	L-AE
10% heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-281,9	Yes	***	L-AF
10% heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-209,2	No	ns	L-AG
10% heterotrofico vs. 50% autotrofico	-350,4	Yes	****	L-AH
10% heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-313,3	Yes	****	L-AI
10% heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-158,9	No	ns	L-AJ
20% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado mixotrofico	-4,833	No	ns	M-N
20% autoclavado autotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	195	No	ns	M-O
20% autoclavado autotrofico vs. 20% autotrofico	-24,67	No	ns	M-P
20% autoclavado autotrofico vs. 20% mixotrofico	-12,5	No	ns	M-Q
20% autoclavado autotrofico vs. 20% heterotrofico	157	No	ns	M-R
20% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	185,8	No	ns	M-S
20% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	188,5	No	ns	M-T
20% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	293,4	Yes	****	M-U
20% autoclavado autotrofico vs. 30% autotrofico	-138,8	No	ns	M-V
20% autoclavado autotrofico vs. 30% mixotrofico	-89,83	No	ns	M-W
20% autoclavado autotrofico vs. 30% heterotrofico	136,5	No	ns	M-X
20% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-65,33	No	ns	M-Y
20% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	198,2	No	ns	M-Z
20% autoclavado autotrofico vs. 40% autotrofico	-123,2	No	ns	M-AB
20% autoclavado autotrofico vs. 40% mixotrofico	-102,3	No	ns	M-AC
20% autoclavado autotrofico vs. 40% heterotrofico	100,5	No	ns	M-AD
20% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-113,7	No	ns	M-AE
20% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-78,1	No	ns	M-AF
20% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-5,467	No	ns	M-AG
20% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-146,6	No	ns	M-AH
20% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	-109,5	No	ns	M-AI
20% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	44,83	No	ns	M-AJ
20% autoclavado mixotrofico vs. 20% autoclavado heterotrofico	199,8	No	ns	N-O
20% autoclavado mixotrofico vs. 20% autotrofico	-19,83	No	ns	N-P
20% autoclavado mixotrofico vs. 20% mixotrofico	-7,667	No	ns	N-Q
20% autoclavado mixotrofico vs. 20% heterotrofico	161,9	No	ns	N-R
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	190,6	No	ns	N-S
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	193,3	No	ns	N-T
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	298,2	Yes	****	N-U
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% autotrofico	-133,9	No	ns	N-V
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-85	No	ns	N-W
20% autoclavado mixotrofico vs. 30% heterotrofico	141,3	No	ns	N-X
20% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-60,5	No	ns	N-Y
20% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	203	No	ns	N-Z
20% autoclavado mixotrofico vs. 40% autotrofico	-118,4	No	ns	N-AB
20% autoclavado mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-97,5	No	ns	N-AC
20% autoclavado mixotrofico vs. 40% heterotrofico	105,3	No	ns	N-AD

20% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-108,9	No	ns	N-AE
20% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-73,27	No	ns	N-AF
20% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-0,6333	No	ns	N-AG
20% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-141,8	No	ns	N-AH
20% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-104,7	No	ns	N-AI
20% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	49,67	No	ns	N-AJ
20% autoclavado heterotrofico vs. 20% autotrofico	-219,7	Yes	*	O-P
20% autoclavado heterotrofico vs. 20% mixotrofico	-207,5	No	ns	O-Q
20% autoclavado heterotrofico vs. 20% heterotrofico	-37,97	No	ns	O-R
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	-9,2	No	ns	O-S
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	-6,5	No	ns	O-T
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	98,37	No	ns	O-U
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% autotrofico	-333,8	Yes	****	O-V
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-284,8	Yes	***	O-W
20% autoclavado heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-58,5	No	ns	O-X
20% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-260,3	Yes	**	O-Y
20% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	3,2	No	ns	O-Z
20% autoclavado heterotrofico vs. 40% autotrofico	-318,2	Yes	****	O-AB
20% autoclavado heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-297,3	Yes	****	O-AC
20% autoclavado heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-94,5	No	ns	O-AD
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-308,7	Yes	****	O-AE
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-273,1	Yes	***	O-AF
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-200,5	No	ns	O-AG
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% autotrofico	-341,6	Yes	****	O-AH
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-304,5	Yes	****	O-AI
20% autoclavado heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-150,2	No	ns	O-AJ
20% autotrofico vs. 20% mixotrofico	12,17	No	ns	P-Q
20% autotrofico vs. 20% heterotrofico	181,7	No	ns	P-R
20% autotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	210,5	No	ns	P-S
20% autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	213,2	No	ns	P-T
20% autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	318	Yes	****	P-U
20% autotrofico vs. 30% autotrofico	-114,1	No	ns	P-V
20% autotrofico vs. 30% mixotrofico	-65,17	No	ns	P-W
20% autotrofico vs. 30% heterotrofico	161,2	No	ns	P-X
20% autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-40,67	No	ns	P-Y
20% autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	222,9	Yes	*	P-Z
20% autotrofico vs. 40% autotrofico	-98,53	No	ns	P-AB
20% autotrofico vs. 40% mixotrofico	-77,67	No	ns	P-AC
20% autotrofico vs. 40% heterotrofico	125,2	No	ns	P-AD
20% autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-89,03	No	ns	P-AE
20% autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-53,43	No	ns	P-AF
20% autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	19,2	No	ns	P-AG
20% autotrofico vs. 50% autotrofico	-122	No	ns	P-AH
20% autotrofico vs. 50% mixotrofico	-84,83	No	ns	P-AI
20% autotrofico vs. 50% heterotrofico	69,5	No	ns	P-AJ
20% mixotrofico vs. 20% heterotrofico	169,5	No	ns	Q-R
20% mixotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	198,3	No	ns	Q-S
20% mixotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	201	No	ns	Q-T
20% mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	305,9	Yes	****	Q-U
20% mixotrofico vs. 30% autotrofico	-126,3	No	ns	Q-V
20% mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-77,33	No	ns	Q-W
20% mixotrofico vs. 30% heterotrofico	149	No	ns	Q-X
20% mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-52,83	No	ns	Q-Y
20% mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	210,7	No	ns	Q-Z
20% mixotrofico vs. 40% autotrofico	-110,7	No	ns	Q-AB
20% mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-89,83	No	ns	Q-AC
20% mixotrofico vs. 40% heterotrofico	113	No	ns	Q-AD
20% mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-101,2	No	ns	Q-AE
20% mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-65,6	No	ns	Q-AF
20% mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	7,033	No	ns	Q-AG
20% mixotrofico vs. 50% autotrofico	-134,1	No	ns	Q-AH
20% mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-97	No	ns	Q-AI
20% mixotrofico vs. 50% heterotrofico	57,33	No	ns	Q-AJ
20% heterotrofico vs. 30% autoclavado autotrofico	28,77	No	ns	R-S

20% heterotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	31,47	No	ns	R-T
20% heterotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	136,3	No	ns	R-U
20% heterotrofico vs. 30% autotrofico	-295,8	Yes	****	R-V
20% heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-246,9	Yes	**	R-W
20% heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-20,53	No	ns	R-X
20% heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-222,4	Yes	*	R-Y
20% heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	41,17	No	ns	R-Z
20% heterotrofico vs. 40% autotrofico	-280,2	Yes	***	R-AB
20% heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-259,4	Yes	**	R-AC
20% heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-56,53	No	ns	R-AD
20% heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-270,7	Yes	***	R-AE
20% heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-235,1	Yes	*	R-AF
20% heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-162,5	No	ns	R-AG
20% heterotrofico vs. 50% autotrofico	-303,7	Yes	****	R-AH
20% heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-266,5	Yes	***	R-AI
20% heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-112,2	No	ns	R-AJ
30% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado mixotrofico	2,7	No	ns	S-T
30% autoclavado autotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	107,6	No	ns	S-U
30% autoclavado autotrofico vs. 30% autotrofico	-324,6	Yes	****	S-V
30% autoclavado autotrofico vs. 30% mixotrofico	-275,6	Yes	***	S-W
30% autoclavado autotrofico vs. 30% heterotrofico	-49,3	No	ns	S-X
30% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-251,1	Yes	**	S-Y
30% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	12,4	No	ns	S-Z
30% autoclavado autotrofico vs. 40% autotrofico	-309	Yes	****	S-AB
30% autoclavado autotrofico vs. 40% mixotrofico	-288,1	Yes	***	S-AC
30% autoclavado autotrofico vs. 40% heterotrofico	-85,3	No	ns	S-AD
30% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-299,5	Yes	****	S-AE
30% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-263,9	Yes	**	S-AF
30% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-191,3	No	ns	S-AG
30% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-332,4	Yes	****	S-AH
30% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	-295,3	Yes	****	S-AI
30% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	-141	No	ns	S-AJ
30% autoclavado mixotrofico vs. 30% autoclavado heterotrofico	104,9	No	ns	T-U
30% autoclavado mixotrofico vs. 30% autotrofico	-327,3	Yes	****	T-V
30% autoclavado mixotrofico vs. 30% mixotrofico	-278,3	Yes	***	T-W
30% autoclavado mixotrofico vs. 30% heterotrofico	-52	No	ns	T-X
30% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-253,8	Yes	**	T-Y
30% autoclavado mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	9,7	No	ns	T-Z
30% autoclavado mixotrofico vs. 40% autotrofico	-311,7	Yes	****	T-AB
30% autoclavado mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-290,8	Yes	****	T-AC
30% autoclavado mixotrofico vs. 40% heterotrofico	-88	No	ns	T-AD
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-302,2	Yes	****	T-AE
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-266,6	Yes	***	T-AF
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-194	No	ns	T-AG
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-335,1	Yes	****	T-AH
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-298	Yes	****	T-AI
30% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	-143,7	No	ns	T-AJ
30% autoclavado heterotrofico vs. 30% autotrofico	-432,1	Yes	****	U-V
30% autoclavado heterotrofico vs. 30% mixotrofico	-383,2	Yes	****	U-W
30% autoclavado heterotrofico vs. 30% heterotrofico	-156,9	No	ns	U-X
30% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-358,7	Yes	****	U-Y
30% autoclavado heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	-95,17	No	ns	U-Z
30% autoclavado heterotrofico vs. 40% autotrofico	-416,6	Yes	****	U-AB
30% autoclavado heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-395,7	Yes	****	U-AC
30% autoclavado heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-192,9	No	ns	U-AD
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-407,1	Yes	****	U-AE
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-371,5	Yes	****	U-AF
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-298,8	Yes	****	U-AG
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% autotrofico	-440	Yes	****	U-AH
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-402,9	Yes	****	U-AI
30% autoclavado heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-248,5	Yes	**	U-AJ
30% autotrofico vs. 30% mixotrofico	48,93	No	ns	V-W
30% autotrofico vs. 30% heterotrofico	275,3	Yes	***	V-X
30% autotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	73,43	No	ns	V-Y

30% autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	337	Yes	****	V-Z
30% autotrofico vs. 40% autotrofico	15,57	No	ns	V-AB
30% autotrofico vs. 40% mixotrofico	36,43	No	ns	V-AC
30% autotrofico vs. 40% heterotrofico	239,3	Yes	**	V-AD
30% autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	25,07	No	ns	V-AE
30% autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	60,67	No	ns	V-AF
30% autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	133,3	No	ns	V-AG
30% autotrofico vs. 50% autotrofico	-7,867	No	ns	V-AH
30% autotrofico vs. 50% mixotrofico	29,27	No	ns	V-AI
30% autotrofico vs. 50% heterotrofico	183,6	No	ns	V-AJ
30% mixotrofico vs. 30% heterotrofico	226,3	Yes	*	W-X
30% mixotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	24,5	No	ns	W-Y
30% mixotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	288	Yes	****	W-Z
30% mixotrofico vs. 40% autotrofico	-33,37	No	ns	W-AB
30% mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-12,5	No	ns	W-AC
30% mixotrofico vs. 40% heterotrofico	190,3	No	ns	W-AD
30% mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-23,87	No	ns	W-AE
30% mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	11,73	No	ns	W-AF
30% mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	84,37	No	ns	W-AG
30% mixotrofico vs. 50% autotrofico	-56,8	No	ns	W-AH
30% mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-19,67	No	ns	W-AI
30% mixotrofico vs. 50% heterotrofico	134,7	No	ns	W-AJ
30% heterotrofico vs. 40% autoclavado autotrofico	-201,8	No	ns	X-Y
30% heterotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	61,7	No	ns	X-Z
30% heterotrofico vs. 40% autotrofico	-259,7	Yes	**	X-AB
30% heterotrofico vs. 40% mixotrofico	-238,8	Yes	**	X-AC
30% heterotrofico vs. 40% heterotrofico	-36	No	ns	X-AD
30% heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-250,2	Yes	**	X-AE
30% heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-214,6	No	ns	X-AF
30% heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-142	No	ns	X-AG
30% heterotrofico vs. 50% autotrofico	-283,1	Yes	****	X-AH
30% heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-246	Yes	**	X-AI
30% heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-91,67	No	ns	X-AJ
40% autoclavado autotrofico vs. 40% autoclavado mixotrofico	263,5	Yes	**	Y-Z
40% autoclavado autotrofico vs. 40% autotrofico	-57,87	No	ns	Y-AB
40% autoclavado autotrofico vs. 40% mixotrofico	-37	No	ns	Y-AC
40% autoclavado autotrofico vs. 40% heterotrofico	165,8	No	ns	Y-AD
40% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-48,37	No	ns	Y-AE
40% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-12,77	No	ns	Y-AF
40% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	59,87	No	ns	Y-AG
40% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-81,3	No	ns	Y-AH
40% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	-44,17	No	ns	Y-AI
40% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	110,2	No	ns	Y-AJ
40% autoclavado mixotrofico vs. 40% autotrofico	-321,4	Yes	****	Z-AB
40% autoclavado mixotrofico vs. 40% mixotrofico	-300,5	Yes	****	Z-AC
40% autoclavado mixotrofico vs. 40% heterotrofico	-97,7	No	ns	Z-AD
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-311,9	Yes	****	Z-AE
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-276,3	Yes	***	Z-AF
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-203,7	No	ns	Z-AG
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-344,8	Yes	****	Z-AH
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-307,7	Yes	****	Z-AI
40% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	-153,4	No	ns	Z-AJ
40% autotrofico vs. 40% mixotrofico	20,87	No	ns	AB-AC
40% autotrofico vs. 40% heterotrofico	223,7	Yes	*	AB-AD
40% autotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	9,5	No	ns	AB-AE
40% autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	45,1	No	ns	AB-AF
40% autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	117,7	No	ns	AB-AG
40% autotrofico vs. 50% autotrofico	-23,43	No	ns	AB-AH
40% autotrofico vs. 50% mixotrofico	13,7	No	ns	AB-AI
40% autotrofico vs. 50% heterotrofico	168	No	ns	AB-AJ
40% mixotrofico vs. 40% heterotrofico	202,8	No	ns	AC-AD
40% mixotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-11,37	No	ns	AC-AE
40% mixotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	24,23	No	ns	AC-AF
40% mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	96,87	No	ns	AC-AG

40% mixotrofico vs. 50% autotrofico	-44,3	No	ns	AC-AH
40% mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-7,167	No	ns	AC-AI
40% mixotrofico vs. 50% heterotrofico	147,2	No	ns	AC-AJ
40% heterotrofico vs. 50% autoclavado autotrofico	-214,2	No	ns	AD-AE
40% heterotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	-178,6	No	ns	AD-AF
40% heterotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	-106	No	ns	AD-AG
40% heterotrofico vs. 50% autotrofico	-247,1	Yes	**	AD-AH
40% heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-210	No	ns	AD-AI
40% heterotrofico vs. 50% heterotrofico	-55,67	No	ns	AD-AJ
50% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado mixotrofico	35,6	No	ns	AE-AF
50% autoclavado autotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	108,2	No	ns	AE-AG
50% autoclavado autotrofico vs. 50% autotrofico	-32,93	No	ns	AE-AH
50% autoclavado autotrofico vs. 50% mixotrofico	4,2	No	ns	AE-AI
50% autoclavado autotrofico vs. 50% heterotrofico	158,5	No	ns	AE-AJ
50% autoclavado mixotrofico vs. 50% autoclavado heterotrofico	72,63	No	ns	AF-AG
50% autoclavado mixotrofico vs. 50% autotrofico	-68,53	No	ns	AF-AH
50% autoclavado mixotrofico vs. 50% mixotrofico	-31,4	No	ns	AF-AI
50% autoclavado mixotrofico vs. 50% heterotrofico	122,9	No	ns	AF-AJ
50% autoclavado heterotrofico vs. 50% autotrofico	-141,2	No	ns	AG-AH
50% autoclavado heterotrofico vs. 50% mixotrofico	-104	No	ns	AG-AI
50% autoclavado heterotrofico vs. 50% heterotrofico	50,3	No	ns	AG-AJ
50% autotrofico vs. 50% mixotrofico	37,13	No	ns	AH-AI
50% autotrofico vs. 50% heterotrofico	191,5	No	ns	AH-AJ
50% mixotrofico vs. 50% heterotrofico	154,3	No	Ns	AI-AJ

5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	40,63	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-201,2	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-206,5	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-3,925	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-7,602	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-244,5	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-192,7	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-47,81	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-52,25	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-243,8	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-197,9	Yes	***
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-98,51	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-91,97	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-240,6	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-223,5	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-120	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-112,5	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-258,6	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-219,2	Yes	****
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-144,7	No	ns
5% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	6,7	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-241,9	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-247,1	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-44,56	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-48,24	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-285,1	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-233,4	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-88,44	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-92,88	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-284,4	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-238,5	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-139,1	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-132,6	No	ns
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-281,3	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-264,1	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-160,7	Yes	*
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-153,1	Yes	*
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-299,2	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-259,8	Yes	****
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-185,3	Yes	***
5% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-33,93	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-5,235	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	197,3	Yes	****
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	193,6	Yes	****
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-43,29	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	8,5	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	153,4	Yes	**
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	149	Yes	*
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-42,54	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	3,317	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	102,7	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	109,2	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-39,4	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-22,29	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	81,17	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	88,75	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-57,35	No	ns

10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-17,95	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	56,55	No	ns
10% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	207,9	Yes	****
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	202,5	Yes	****
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	198,9	Yes	****
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-38,06	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	13,74	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	158,6	Yes	**
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	154,2	Yes	**
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-37,3	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	8,553	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	107,9	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	114,5	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-34,16	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-17,05	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	86,41	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	93,98	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-52,11	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-12,71	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	61,79	No	ns
10% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	213,2	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-3,676	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-240,6	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-188,8	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-43,88	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-48,32	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-239,8	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-194	Yes	***
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-94,58	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-88,05	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-236,7	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-219,6	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-116,1	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-108,5	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-254,6	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-215,2	Yes	****
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-140,7	No	ns
10% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	10,63	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-236,9	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-185,1	Yes	***
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-40,21	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-44,65	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-236,2	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-190,3	Yes	***
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-90,91	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-84,37	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-233	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-215,9	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-112,4	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-104,9	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-251	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-211,6	Yes	****
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-137,1	No	ns
10% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	14,3	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	51,79	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	196,7	Yes	****
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	192,3	Yes	****

20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	0,7542	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	46,61	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	146	Yes	*
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	152,5	Yes	*
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	3,897	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	21	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	124,5	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	132	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-14,05	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	25,35	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	99,85	No	ns
20% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	251,2	Yes	****
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	144,9	Yes	*
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	140,5	Yes	*
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-51,04	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-5,183	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	94,21	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	100,7	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-47,9	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-30,79	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	72,67	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	80,25	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-65,85	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-26,45	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	48,05	No	ns
20% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	199,4	Yes	****
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-4,441	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-196	Yes	****
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-150,1	Yes	*
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-50,7	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-44,17	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-192,8	Yes	***
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-175,7	Yes	**
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-72,24	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-64,67	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-210,8	Yes	****
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-171,4	Yes	**
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-96,86	No	ns
20% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	54,51	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-191,5	Yes	****
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-145,7	Yes	*
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-46,26	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-39,72	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-188,4	Yes	***
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-171,3	Yes	**
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-67,8	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-60,22	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-206,3	Yes	****
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-166,9	Yes	**
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-92,42	No	ns
20% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	58,95	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	45,86	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	145,3	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	151,8	Yes	*
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	3,143	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	20,25	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	123,7	No	ns

30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	131,3	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-14,81	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	24,59	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	99,09	No	ns
30% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	250,5	Yes	****
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	99,39	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	105,9	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-42,71	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-25,61	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	77,86	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	85,43	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-60,66	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-21,26	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	53,24	No	ns
30% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	204,6	Yes	****
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	6,536	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-142,1	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-125	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-21,54	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-13,96	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-160,1	Yes	*
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-120,7	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-46,16	No	ns
30% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	105,2	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-148,6	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-131,5	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-28,07	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-20,5	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-166,6	Yes	**
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-127,2	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-52,69	No	ns
30% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	98,67	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	17,11	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	120,6	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	128,1	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-17,95	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	21,45	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	95,95	No	ns
40% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	247,3	Yes	****
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	103,5	No	ns
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	111	No	ns
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-35,06	No	ns
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	4,343	No	ns
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	78,84	No	ns
40% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	230,2	Yes	****
40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	7,571	No	ns
40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-138,5	No	ns
40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-99,12	No	ns
40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-24,62	No	ns
40% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	126,7	No	ns
40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO	-146,1	No	ns
40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	-106,7	No	ns
40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	-32,19	No	ns
40% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	119,2	No	ns
50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO	39,4	No	ns
50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	113,9	No	ns
50% AUTOTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	265,3	Yes	****

50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO	74,5	No	ns
50% AUTOTROFICO SEM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	225,9	Yes	****
50% HETEROTROFICO COM FILTRAÇÃO vs. 50% HETEROTROFICO SEM FILTRAÇÃO	151,4	Yes	*