

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA

**Processamento de biomassa microalgal-bacteriana em reator anaeróbio
contínuo**

Ana Paula Maciel de Castro
Magister Scientiae

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2026**

ANA PAULA MACIEL DE CASTRO

Processamento de biomassa microalgal-bacteriana em reator anaeróbio contínuo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

Orientadora: Maria Lucia Calijuri

Coorientador: Marcelo Zaiat

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C355p
2026

Castro, Ana Paula Maciel de, 1999-

Processamento de biomassa microalgal-bacteriana em reator anaeróbico contínuo / Ana Paula Maciel de Castro. – Viçosa, MG, 2026.

1 dissertação eletrônica (90 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Maria Lúcia Calijuri.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa, Departamento de Engenharia Civil, 2026.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2026.463>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Digestão anaeróbia. 2. Bactérias anaeróbicas.
3. Biomassa. 4. Microalgas. I. Calijuri, Maria Lúcia, 1955-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Engenharia Civil. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil.
III. Título.

CDD 22. ed. 628.354

ANA PAULA MACIEL DE CASTRO

Processamento de biomassa microalgal-bacteriana em reator anaeróbio contínuo

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 3 de março de 2026.

Assentimento:

Ana Paula Maciel de Castro
Autora

Maria Lucia Calijuri
Orientadora

Essa dissertação foi assinada digitalmente pela autora em 14/08/2026 às 15:29:25 e pela orientadora em 14/08/2026 às 16:06:53. As assinaturas têm validade legal, conforme o disposto na Medida Provisória 2.200-2/2001 e na Resolução nº 37/2012 do CONARQ. Para conferir a autenticidade, acesse <https://siadoc.ufv.br/validar-documento>. No campo 'Código de registro', informe o código **YK9I.A4JY.DED3** e clique no botão 'Validar documento'.

À minha mãe, amor da minha vida, in memoriam.

Meus sonhos vivem porque você vive em mim.

Por você. Tudo. Sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que me deu o dom da vida, da fortaleza e da ciência para que conseguisse chegar até aqui com propósito e fé;

Aos meus pais, Maria José e Junior, por nunca medirem esforços para sonhar meus sonhos e por terem sido abrigo, força, amor e direção em cada segundo da minha vida;

Ao meu amor, Rodrigo, que atravessou comigo o que só nós sabemos, dividiu o peso quando a vida pediu coragem, e fez do amor um lugar seguro e feliz;

À professora Maria Lúcia Calijuri, pela orientação firme, exigente e generosa. Este trabalho carrega sua mão na ciência e seu coração na minha história;

Ao professor Marcelo Zaiat e toda sua equipe que tanto me auxiliaram nessa empreitada, sempre disponíveis e generosos com seus conhecimentos;

Aos Doutores Thiago Abrantes Silva e Nayara Vilela Avelar, pelo suporte, presença constante, carinho e humanidade com que me conduziram durante todas as etapas deste trabalho;

Ao grupo de estudos SIGEOnPA, pela acolhida, construção conjunta de conhecimento e parceria diária que fortaleceram essa trajetória acadêmica;

Aos estagiários Ana Beatriz, Thales e Lucca, que caminharam comigo em laboratório e tornaram o trabalho mais leve, divertido e possível;

Aos meus padrinhos, Cris e Elaine, Mônica e Leandro (e ao maior presente que eles já me deram, minha querida afilhada Maria Liz), por terem sido minha segunda família. Sem seu amor, cuidado e apoio, a realização desse sonho não seria possível;

À Eliza, André, Vitor e Maria Tereza, meus primos-irmãos de alma, que nunca me deixaram sentir só na vida. E a toda a minha família, por serem minhas raízes e minha alegria sempre;

Às melhores amigas que eu poderia ter, Marcela, Manoela, Ana Clara, Isadora, Alice e Maria Lúcia, por permanecerem comigo e serem parte essencial da minha história;

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação e pertencer a uma universidade tão bela e tão rica em conhecimento;

Por fim, agradeço a todos que, mesmo não sendo citados nominalmente, tiveram participação importante para que este objetivo se concretizasse;

Este trabalho foi realizado com o apoio das seguintes agências de

pesquisa brasileiras: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“Pouco conhecimento afasta de Deus.

Muito conhecimento conduz a ele”.

(Louis Pasteur)

RESUMO

CASTRO, Ana Paula Maciel de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, março de 2026. **Processamento de biomassa microalgal-bacteriana em reator anaeróbio contínuo**. Orientadora: Maria Lucia Calijuri. Coorientador: Marcelo Zaiat.

A biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias apresenta potencial para integração a rotas tecnológicas de tratamento de efluentes e recuperação de recursos. Rica em matéria orgânica e nutrientes, pode ser direcionada à digestão anaeróbia, visando sua estabilização e a produção de biogás. No presente estudo, avaliou-se o desempenho técnico, ambiental e econômico do processamento anaeróbio de biomassa de microalgas cultivada em águas residuárias domésticas em reator anaeróbio contínuo de leito estruturado, operado sob diferentes cargas orgânicas volumétricas (3 e 5 kg DQO m³ d⁻¹) e condições de pH afluente (não ajustado, 5 e 3), com o objetivo inicial de direcionar o processo à produção fermentativa de hidrogênio. Foram avaliados o consumo de matéria orgânica, a conversão de carboidratos, a remoção de compostos nitrogenados, a formação de ácidos graxos voláteis e a produção e composição do biogás. Em ambos os reatores, observou-se consumo de matéria orgânica e elevada remoção de nitrato (77–99%), com formação limitada de metabólitos solúveis e produção residual de metano. A produção fermentativa de hidrogênio não foi estabelecida em nenhuma condição. A baixa disponibilidade de frações prontamente fermentáveis e o elevado teor de nitrogênio da biomassa favoreceram rotas metabólicas competitivas, especialmente a desnitrificação, restringindo a recuperação energética. A avaliação ambiental, conduzida por meio de Análise de Ciclo de Vida (ACV) com dados experimentais primários e modelagem no Aspen Plus, indicou desempenho globalmente favorável, com benefícios líquidos em todas as categorias de impacto avaliadas, com destaque para a toxicidade humana carcinogênica (-48,34%), seguida pelas categorias de ecotoxicidade de água doce (-21,46%) e marinha (-16,79%), fortemente influenciados pelo uso de águas residuárias e pela recuperação de recursos considerados como produtos evitados. A análise econômica estimou um preço mínimo de venda (PMV) do biogás de USD 270,97 kWh⁻¹ no cenário base, reduzindo-se em até 96,6% com o aumento da capacidade de processamento, mas permanecendo acima dos valores reportados na literatura, o que evidencia que a viabilidade é limitada pelo baixo rendimento de conversão da matéria orgânica em energia. Conclui-se que, embora a produção de H₂ não tenha sido alcançada, a condição operacional de 5 kg DQO m⁻³ d⁻¹

apresentou desempenho mais adequado em termos de processamento do substrato e estabilidade operacional. Nas condições avaliadas, o sistema mostrou-se mais relevante como etapa complementar de manejo e conversão de nutrientes da biomassa no contexto do saneamento ambiental do que como rota eficiente de valorização energética, permanecendo a intensificação da recuperação de energia como perspectiva para estudos futuros.

Palavras-chave: processamento anaeróbio; biomassa microalgal-bacteriana; avaliação do ciclo de vida; recuperação de recursos; economia circular

ABSTRACT

CASTRO, Ana Paula Maciel de, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, March, 2026. **Processing of microalgal-bacterial biomass in a continuous anaerobic reactor**. Adviser: Maria Lucia Calijuri. Co-adviser: Marcelo Zaiat.

Microalgal-bacterial biomass cultivated in wastewater shows potential for integration into technological routes for effluent treatment and resource recovery. Rich in organic matter and nutrients, it can be directed to anaerobic digestion, aiming at its stabilization and biogas production. In the present study, the technical, environmental, and economic performance of the anaerobic processing of microalgal biomass cultivated in domestic wastewater was evaluated in a continuous structured-bed anaerobic reactor, operated under different organic loading rates (3 and 5 kg COD m⁻³ d⁻¹) and influent pH conditions (unadjusted, 5, and 3), with the initial goal of directing the process toward fermentative hydrogen production. Organic matter consumption, carbohydrate conversion, nitrogen compound removal, volatile fatty acid formation, and biogas production, and composition were assessed. In both reactors, organic matter consumption and high nitrate removal (77-99%) were observed, along with limited formation of soluble metabolites and residual methane production. Fermentative hydrogen production was not established under any conditions. The low availability of readily fermentable fractions and the high nitrogen content of the biomass favored competitive metabolic routes, particularly denitrification, restricting energy recovery. The environmental assessment, conducted through Life Cycle Assessment (LCA) based on primary experimental data and process modeling in Aspen Plus, indicated globally favorable performance, with net benefits across all impact categories evaluated, especially human carcinogenic toxicity (-48.34%), followed by freshwater (-21.46%) and marine (-16.79%) ecotoxicity, strongly influenced by the use of wastewater and by resource recovery considered as avoided products. The economic analysis estimated a minimum selling price (MSP) of biogas of USD 270.97 kWh⁻¹ in the base scenario, decreasing by up to 96.6% with increased processing capacity, but remaining above values reported in the literature, evidencing that viability is limited by the low conversion yield of organic matter into energy. It is concluded that, although H₂ production was not achieved, the operational condition of 5 kg COD m⁻³ d⁻¹ showed more adequate performance in terms of substrate processing and operational stability. Under the conditions evaluated, the system proved more relevant as a complementary stage for managing and converting biomass nutrients

within the context of environmental sanitation than as an efficient route for energy valorization, with the intensification of energy recovery remaining a perspective for future studies.

Keywords: anaerobic digestion; microalgal–bacterial biomass; life cycle assessment; resource recovery; circular economy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figure 4.1. Overview of the anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR) used in the experiments.....	27
Figure 4.2. Carbohydrate concentration profiles (mg L ⁻¹) in the influent and effluent during the operational period (day) in reactors R1 (a) and R2 (b).....	36
Figure 4.3. Nitrate removal profiles under different operational conditions during the operational period (day) in reactors R1 and R2.....	37
Figure 4.4. Daily biogas production (mL d ⁻¹) in R1 and R2 during reactor operation.....	39
Figure 4.5. Temporal evolution of CH ₄ , CO ₂ and N ₂ production (mL d ⁻¹) during the operational period* (day) in reactors R1 (a) and R2 (b).....	40
Figure 4.6. Mean concentrations of organic acids (mmol L ⁻¹) measured at the inlet and outlet of reactors R1 and R2 at the initial and final stages of operation.....	41
Figure 4.7. Shannon index (a) and Multidimensional Scaling (b) of the inoculum and of the compartments of R1 and R2 at the end of the operational period.	44
Figure 4.8. Taxonomic distribution according to 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis at the phylum (a) and genus (b) levels of the microbial community present in the inoculum and in the compartments of R1 and R2 at the end of the operational period.	45
Figura 5.1. Diagrama simplificado do processo de valorização e tratamento da BMB através da digestão anaeróbia.....	60
Figura 5.2. Diagrama de fluxo de processos da digestão anaeróbia de BMB	66
Figura 5.3. Fluxo de massa do processo de digestão anaeróbia da biomassa	67
Figura 5.4. Potência energética requerida por cada equipamento no sistema avaliado	68
Figura 5.5. CAPEX e OPEX do processo de obtenção do biogás através da digestão anaeróbia de BMB (11 m ³ h ⁻¹).....	69
Figura 5.6. Preço do kWh em relação à vazão de entrada do sistema.....	70
Figura 5.7. Impactos ambientais normalizados	73
Figura 5.8. Análise de contribuição por processo no sistema analisado	76

LISTA DE TABELAS

Table 4.1. Experimental design of the AnSTBRs (R1 and R2).....	28
Table 4.2. pH monitoring of reactor R1 during operation, showing influent and effluent values, including pH after acidification.....	29
Table 4.3. pH monitoring of reactor R2 during operation, showing influent and effluent values, including pH after acidification.....	30
Table 4.4. COD removal data for R1 and R2 during the experimental period	33
Table 4.5. Concentrations of organic acids (mM/L) in the influent and effluent of reactors R1 and R2, with the corresponding consumption and removal efficiency	41
Tabela 5.1. Resumo dos parâmetros econômicos e custos de matéria-prima e utilidade empregados na análise econômica do tratamento anaeróbio e da valorização da BMB.	62
Tabela 5.2. Inventário simplificado de ciclo de vida da digestão anaeróbia	72

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ACV	Avaliação do Ciclo de Vida
AnSTBR	Anaerobic Structured Bed Reactor
APHA	American Public Health Association
ASV	Amplicon Sequence Variant
BDZ	Bed Zone
BMB	Biomassa microalgal-bacteriana
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CAPEX	Capital Expenditure
CH ₄	Metano
C/N	Relação carbono/nitrogênio
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COD	Chemical Oxygen Demand
CO ₂	Dióxido de carbono
COV	Carga orgânica volumétrica
DA	Digestão anaeróbia
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic Acid)
DNRA	Dissimilatory Nitrate Reduction to Ammonium
DO	Dissolved Oxygen
DQO	Demanda Química de Oxigênio
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FDC	Feeding Chamber

GC Gas Chromatography

GC/TCD Gas Chromatography with Thermal Conductivity Detector

H₂ Hidrogênio

HAc Ácido acético

HBu Ácido butírico

HCl Ácido cítrico

HFo Ácido fórmico

HIBu Ácido isobutírico

HPLC High-Performance Liquid Chromatography

HPLC-DAD High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector

HPr Ácido propiônico

HRAP High-Rate Algal Pond

HRT Hydraulic Retention Time

HSu Ácido succínico

kWh Quilowatt-hora

LCA Life Cycle Assessment

LDPE Low-Density Polyethylene

MBCB Microalgal-Bacterial Consortium Biomass

MY Methane Yield

N₂ Nitrogênio gasoso

NH₄⁺ Nitrogênio amoniacal

NO₃⁻ Nitrato

NGS Next-Generation Sequencing

OLR Organic Loading Rate

OPEX	Operational Expenditure
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PD	Phylogenetic Diversity
PHB	Polihidroxibutirato (Polyhydroxybutyrate)
PMV	Preço Mínimo de Venda
rRNA	Ácido ribonucleico ribossomal (Ribosomal Ribonucleic Acid)
STP	Standard Temperature and Pressure
TEA	Techno-Economic Assessment
TKN	Nitrogênio Kjeldahl Total
TOC	Total Organic Carbon
TP	Fósforo Total
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UFLA	Universidade Federal de Lavras
USD	Dólar dos Estados Unidos (United States Dollar)
VFA	Volatile Fatty Acid
VSS	Sólidos Suspensos Voláteis (Volatile Suspended Solids)
WtE	Waste-to-Energy
ΔG°	Energia livre padrão de Gibbs

APRESENTAÇÃO

Este trabalho é parte das pesquisas desenvolvidas no Núcleo de Pesquisas Ambientais Avançadas (nPA) do Departamento de Engenharia Civil da Universidade Federal de Viçosa (UFV), no âmbito do tratamento de águas residuárias por meio do cultivo de microalgas, com foco na integração entre recuperação de recursos, produção de bioenergia e sustentabilidade ambiental. Os estudos realizados concentram-se na avaliação do uso de biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias domésticas como substrato em processos anaeróbios contínuos, visando à produção de bioenergia e à redução de impactos ambientais associados ao manejo de resíduos.

No presente estudo, a ênfase foi dada à avaliação técnica, ambiental e econômica do uso de um reator anaeróbio contínuo no tratamento e na valorização da biomassa microalgal-bacteriana. Foram investigados o desempenho operacional do sistema, as rotas metabólicas predominantes e os efeitos de diferentes condições operacionais sobre a conversão da biomassa, bem como os potenciais benefícios ambientais e econômicos associados à recuperação energética e à substituição parcial de insumos e recursos convencionais.

Este documento está organizado em dois capítulos. O primeiro apresenta a avaliação experimental do desempenho de um reator anaeróbio contínuo de leito estruturado alimentado com biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias domésticas, abordando aspectos operacionais e limitações metabólicas. O segundo capítulo é dedicado à avaliação ambiental e econômica do sistema estudado, realizada por meio da Análise de Ciclo de Vida (ACV) e da Avaliação Técnico-Econômica (TEA), nas quais foram identificados os principais impactos ambientais e analisada a viabilidade econômica do processo investigado no primeiro capítulo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	18
2. HIPÓTESES	21
3. OBJETIVO	22
3.1. Objetivo Geral	22
3.2. Objetivos Específicos	22
4. CAPÍTULO I: CONTINUOUS FERMENTATION OF WASTEWATER-GROWN MICROALGAL-BACTERIAL BIOMASS: RESIDUAL NITROGEN GOVERNS METABOLIC ROUTE SELECTION	23
4.1. Introduction.....	24
4.2. Materials and methods	26
4.3. Results and discussion	32
4.4. Conclusion	47
5. CAPÍTULO II: DIGESTÃO ANAERÓBIA COMO ROTA DE VALORIZAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS: UMA PERSPECTIVA ECONÔMICA E AMBIENTAL	56
5.1. Introdução	57
5.2. Metodologia	59
5.3. Resultados e discussão.....	64
5.4. Conclusão	75
Referências	79
6. CONCLUSÃO GERAL.....	86
REFERÊNCIAS.....	88

1. INTRODUÇÃO GERAL

Resíduos e efluentes gerados por atividades urbanas, industriais e agroindustriais concentram elevada carga orgânica e nutrientes, configurando simultaneamente um desafio ambiental e uma oportunidade para a recuperação de energia e recursos (Prajapati et al., 2026). Tradicionalmente tratados como passivos ambientais, esses fluxos podem ser integrados a rotas de conversão biológica capazes de promover o tratamento da matéria orgânica e a geração de produtos energéticos, fortalecendo a interface entre saneamento ambiental e recuperação de recursos (Govindasamy e Balaji, 2025).

Nesse contexto, os processos anaeróbios ocupam posição de destaque devido à ampla aplicação no tratamento de resíduos e efluentes e à capacidade de converter matéria orgânica em produtos energéticos (Salazar-Batres e Moreno-Andrade, 2025; Silva et al., 2026). Essa conversão no processo de digestão anaeróbia (DA) ocorre por meio de rotas metabólicas sequenciais e interdependentes, nas quais diferentes grupos microbianos atuam de forma coordenada. Entre essas rotas, destacam-se a acidogênese e a metanogênese, etapas centrais para a estabilização do substrato e a recuperação energética. Na acidogênese, compostos orgânicos complexos são convertidos em metabólitos intermediários, como ácidos graxos voláteis, alcoóis, hidrogênio e dióxido de carbono, que servem de base para a metanogênese, etapa final de conversão da matéria orgânica em metano.

A DA de biomassa microalgal-bacteriana (BMB) apresenta elevado potencial de integração entre sistemas de tratamento de efluentes e produção de energia (Calijuri et al., 2025). Enquanto o cultivo de microalgas em águas residuárias permite integrar remoção de nutrientes e assimilação de carbono, a BMB gerada nesse processo possui características bioquímicas e microbiológicas que podem favorecer seu comportamento em processos subsequentes de valorização energética (Li et al., 2025; Maciel de Castro et al., 2026). Porém, embora a DA seja amplamente consolidada como rota energética, sua aplicação a biomassas complexas, como a BMB, impõe desafios relacionados à biodisponibilidade dos compostos orgânicos e à dinâmica metabólica estabelecida em sistemas contínuos (Assemany et al., 2020).

Entre as características intrínsecas da biomassa microalgal, o teor de nitrogênio merece atenção, uma vez que esse substrato apresenta, em geral, elevada fração proteica,

podendo representar entre 42% e 58% da massa seca em *Chlorella vulgaris* (Safi et al., 2014). A liberação de compostos nitrogenados durante a degradação anaeróbia pode influenciar a atividade microbiana e o equilíbrio entre as rotas metabólicas, afetando as condições químicas do meio e a disponibilidade de nutrientes. Embora represente um diferencial em relação a outros substratos, o impacto do nitrogênio sobre o desempenho do processo depende fortemente das condições operacionais e da configuração do sistema, tornando sua compreensão relevante no contexto da valorização energética da biomassa microalgal.

Além da composição química, a estrutura da parede celular das microalgas representa um dos principais entraves à conversão eficiente da biomassa em bioenergia por via anaeróbia. Em espécies como *Chlorella vulgaris*, a composição da parede celular confere rigidez e baixa biodegradabilidade (Bohutskyi et al., 2014). Essa barreira física limita o acesso dos microrganismos hidrolíticos ao material intracelular, fazendo com que a etapa de hidrólise seja apontada como a fase limitante da digestão anaeróbia de biomassa microalgal (Mahdy et al., 2014). Estratégias de ruptura celular - térmicas, mecânicas, químicas, enzimáticas ou combinadas - têm sido amplamente investigadas para aumentar a solubilização da matéria orgânica e a disponibilidade de substrato; contudo, tais etapas adicionais elevam o consumo energético e os custos operacionais, comprometendo a viabilidade técnico-econômica do processo em escala ampliada (Passos et al., 2014).

A predominância das rotas metabólicas anaeróbias também é fortemente condicionada por variáveis operacionais, especialmente o pH e a carga orgânica volumétrica (COV). O pH atua como fator seletivo das comunidades microbianas, influenciando a atividade relativa de microrganismos acidogênicos e metanogênicos, enquanto a COV determina a taxa de fornecimento de substrato e o balanço entre produção e consumo de metabólitos intermediários (Ghimire et al. 2015). Determinadas condições podem favorecer rotas fermentativas em detrimento da conversão metanogênica, ou vice-versa, tornando o controle desses parâmetros estratégico para a eficiência de sistemas contínuos.

Entretanto, a avaliação do desempenho técnico isoladamente não é suficiente para verificar a viabilidade de rotas bioenergéticas associadas ao saneamento ambiental. A incorporação desses sistemas em cadeias de tratamento e recuperação de recursos exige

a consideração de aspectos econômicos e ambientais, de modo a avaliar se os benefícios energéticos são acompanhados por reduções efetivas de impactos e por condições economicamente viáveis (Geng et al., 2025). Nesse sentido, ferramentas como a Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) permitem quantificar impactos ao longo do sistema e identificar pontos críticos. E, de forma complementar, análises econômicas baseadas em dados operacionais reais são essenciais para reduzir incertezas e aumentar a representatividade das avaliações. Informações sobre vazões, composição das correntes, consumo energético e produção efetiva de biogás possibilitam a construção de balanços de massa e energia consistentes, fortalecendo a análise integrada do sistema (Mohit et al., 2024).

Assim, a presente dissertação está estruturada em dois capítulos:

- O Capítulo 1: “*Continuous fermentation of wastewater-grown microalgal-bacterial biomass: Residual nitrogen governs metabolic route selection*” avalia o desempenho de sistemas anaeróbios contínuos alimentados com biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias, com ênfase no direcionamento metabólico ocorrido a partir das condições operacionais impostas;
- O Capítulo 2: “*Digestão anaeróbia como rota de valorização de biomassa de microalgas cultivadas em águas residuárias: uma perspectiva econômica e ambiental*”, aborda a avaliação econômica e ambiental do processamento anaeróbio dessa biomassa, considerando os resultados obtidos experimentalmente na operação contínua com COV $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, do Capítulo 1 deste trabalho.

Em conjunto, os capítulos permitem uma análise integrada dos aspectos técnicos, econômicos e ambientais associados à valorização anaeróbia de biomassas microalgais no contexto do saneamento ambiental.

2. HIPÓTESES

- A biomassa microalgal-bacteriana (BMB) cultivada em águas residuárias domésticas pode ser valorizada energeticamente por meio de processo anaeróbio em reator contínuo de leito estruturado, integrando tratamento de efluentes e recuperação de energia;
- Existe uma combinação de carga orgânica volumétrica e pH afluente que favorece o direcionamento metabólico do sistema para a produção fermentativa de hidrogênio;
- A valorização da BMB cultivada em águas residuárias por meio do processamento anaeróbio é ambiental e economicamente viável, com benefícios líquidos associados ao uso de águas residuárias e à recuperação de recursos;
- A viabilidade econômica do processo é condicionada ao rendimento de conversão da matéria orgânica em biogás e à capacidade de processamento do sistema.

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o processamento anaeróbio de BMB cultivada em águas residuárias, em reator contínuo de leito estruturado, como rota de valorização energética, considerando o desempenho técnico do processo, o direcionamento metabólico diante das condições operacionais impostas, e suas implicações econômicas e ambientais.

3.2. Objetivos Específicos

- Investigar o direcionamento das rotas metabólicas durante o processamento anaeróbio da BMB cultivada em águas residuárias, com base na conversão da matéria orgânica e dos compostos nitrogenados e na formação de gases e metabólitos energéticos;
- Avaliar a influência das características do substrato, da COV e do pH no direcionamento das rotas metabólicas durante o processamento anaeróbio da BMB;
- Avaliar a viabilidade econômica do processamento anaeróbio da BMB como rota de valorização energética, com base em dados experimentais reais de operação contínua com COV de $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$.
- Avaliar os impactos ambientais associados ao processamento anaeróbio da BMB cultivada em águas residuárias, com COV de $5 \text{ kg DQO m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, por meio da Avaliação do Ciclo de Vida.

4. CAPÍTULO I: CONTINUOUS FERMENTATION OF WASTEWATER-GROWN MICROALGAL-BACTERIAL BIOMASS: RESIDUAL NITROGEN GOVERNS METABOLIC ROUTE SELECTION

Abstract: Microalgae cultivation in wastewater simultaneously treats the effluent and generates biomass, converting a waste resource into an energy feedstock. Fermentative biohydrogen (bioH₂) production from microalgal-bacterial consortium biomass (MBCB) has been widely proposed, but the supporting evidence derives mostly from batch assays, leaving its behavior under continuous operation poorly understood. This study evaluated two continuous anaerobic structured-bed reactors (AnSTBRs) fed with MBCB cultivated in domestic sewage, operated at 25 °C for 69 days under organic loading rates (OLRs) of 3 and 5 kg COD m⁻³ d⁻¹, with the influent pH progressively reduced from uncontrolled to 5 and 3. Performance was assessed through organic matter and carbohydrate consumption, nitrogen removal, gas composition, and microbial community structure (16S rRNA gene). Fermentative bioH₂ production was not established under any of the evaluated conditions. The biomass exhibited low concentrations of readily fermentable carbohydrates (53–55 mg L⁻¹) and high nitrate levels, favoring competing metabolic pathways, with denitrification progressively becoming dominant and resulting in nitrate removal efficiencies of 77–99% and a gas phase composed predominantly of N₂ (77–88%). Despite influent acidification to pH 3, the effluent pH remained close to neutrality, indicating strong internal buffering. Sequencing revealed a spatial organization of metabolic functions, with hydrolytic and fermentative microorganisms predominating in the suspended biomass and nitrate reducers in the attached biomass. Residual nitrogen was the decisive factor in metabolic route selection. Nitrogen removal represents the immediate application of these systems, whereas substrate conditioning is required to enable fermentative pathways.

Keywords: Microalgae; Wastewater treatment; Biohydrogen; Denitrification; Structured-bed reactor; Resource recovery.

4.1. Introduction

Microalgae cultivation in wastewater integrates effluent treatment with biomass production, converting a resource that would otherwise be discarded into a feedstock for energy production (Silva et al., 2025; Ferreira et al., 2025). The resulting microalgal-bacterial consortium biomass (MBCB) exhibits a symbiotic interaction between microalgal and bacterial communities, which may favor its application in dark fermentation systems targeting biohydrogen (bioH₂) production (Silva et al., 2025). However, its biochemical composition directly influences the metabolic pathways established during anaerobic processing (Ferreira et al., 2025). Although the carbohydrate fraction may be quantitatively significant, a large share is not readily available because of the rigid microalgal cell wall, which limits access by fermentative microorganisms; for this reason, pretreatment is commonly applied before the biomass is subjected to processes aimed at recovering intracellular compounds (Singh et al., 2022) .

Depending on microbial activity, environmental conditions, and the available electron balance, fermentative routes associated with the degradation of soluble carbohydrate may promote the formation of H₂ and volatile fatty acids (VFA), whereas competing routes consume intermediates and reduce H₂ accumulation (Hidaka et al., 2025; Sinha & Pandey, 2011) . In nitrogen-rich substrates, denitrification acts as a major electron sink, competing directly with fermentative microorganisms for the available electron donors; in microalgal-bacterial systems, the high availability of nitrite and nitrate may intensify denitrification and redirect metabolic flux (Andalib et al., 2011).

In batch assays, dark fermentation of this biomass has already been demonstrated to be feasible. Silva et al. (2025) evaluated MBCB cultivated in high-rate algal ponds treating domestic wastewater as an inoculum for bioH₂ production. Both raw (RB) and thermally pretreated biomass (PB; 120 °C, 30 min, 1 atm) were subjected to natural fermentation for 5, 10, and 15 days prior to biohydrogen production potential assays using glucose as the standardized substrate. Although formally applied as an inoculum, the biomass also acted as a secondary substrate, as the second exponential phase of bioH₂ production – observed after glucose depletion – was attributed to the metabolism of more complex compounds derived from the MBCB itself. Total carbohydrate conversion efficiency exceeded 98 % under all conditions tested, with yields ranging from 2.44 to 3.58 mmol H₂ g⁻¹ CHt and a soluble metabolite profile dominated by acetate and butyrate-

producing routes, consistent with the metabolism typically observed in dark fermentation. The highest production rate ($1.25 \pm 0.08 \text{ mmol H}_2 \text{ h}^{-1}$) was obtained with raw biomass naturally fermented for five days (RB-5), which eliminated the energy demand associated with thermal pretreatment and therefore represented the most favorable condition from both energetic and operational perspectives. 16S rRNA gene sequencing revealed microbial diversity and richness approximately threefold higher in raw than in pretreated biomass, indicating that natural fermentation alone is sufficient to enrich autochthonous fermentative microbial consortia from the MBCB itself, eliminating the need for an external inoculum. These findings support the hypothesis that MBCB can simultaneously serve as both inoculum and substrate. However, the behavior of this process under continuous operation remains largely unexplored.

In this regime, operating conditions such as the organic loading rate (OLR) and pH govern dark fermentation performance, as they affect microbial activity, substrate conversion, and metabolite accumulation (Cavalcante et al., 2023; Greses et al., 2024). Higher OLRs increase conversion rates up to a critical threshold, beyond which process stability is compromised (Cavalcante et al., 2023). Slightly acidic conditions tend to favor acidogenesis and VFA accumulation, whereas near-neutral pH is associated with methanogenesis (Ganesh Saratale et al., 2018). Among continuous configurations, anaerobic structured-bed reactors (AnSTBRs) stand out for the ordered arrangement of their support medium, which enhances biomass retention and operational stability while maintaining high void fractions, and have been associated with efficient substrate conversion, acidogenic performance, and lower energy demand (Fuess et al., 2017).

Given this gap and the potential demonstrated by Silva et al. (2025) for MBCB under batch conditions, this study assessed the metabolic behavior of continuous AnSTBRs fed with MBCB under different OLRs and influent pH values, evaluating biogas production and composition together with the consumption of organic matter, carbohydrates, and nitrogen compounds. In contrast to the conventional methanogenic approach, the process was investigated from a fermentative and metabolic perspective, testing the hypothesis that the intrinsic features of the biomass – chiefly the low accessibility of its carbohydrates and the high availability of nitrogen – govern the selection of metabolic routes during continuous operation, and may prevail over operational strategies aimed at promoting fermentative metabolism.

4.2. Materials and methods

4.2.1. *Substrate: origin, production and characterization of the MBCB*

The MBCB was cultivated at the experimental facilities of a university laboratory in southeastern Brazil. The high-rate algal ponds (HRAPs) were constructed at the pilot scale with a width of 1.28 m, a length of 2.86 m, a total depth of 0.50 m, a working depth of 0.30 m, a surface area of 3.30 m², and a working volume of 1.00 m³. Mixing was provided by paddlewheels equipped with six stainless-steel blades, driven by a 1 hp electric motor. The rotational speed was controlled by a gearbox and a frequency inverter (WEG, CFW-08 series), maintaining flow velocities between 0.10 and 0.15 m s⁻¹. The domestic sewage used for cultivation was collected from a wastewater treatment facility serving approximately 69 households after preliminary treatment in a septic tank followed by an anaerobic filter.

The HRAPs were operated in semi-continuous mode, with a hydraulic retention time (HRT) between 7 and 10 days. The daily influent and effluent volumes were adjusted according to sewage availability and to the average biomass demand required to feed the continuous anaerobic reactors. After cultivation, the pond effluent was routed to settling tanks for biomass separation. The settled biomass was collected and transferred to storage containers connected to the reactor feeding system, where a low-flow submersible pump kept the biomass well mixed and in suspension throughout operation.

The influent sewage was characterized by determining the following parameters: volatile suspended solids (VSS), N-NO₃⁻, N-NH₄⁺, TKN, COD, and total phosphorus (TP), determined according to Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater (American Public Health Association, 2023); total organic carbon (TOC), measured with a Shimadzu TOC-5000 analyzer; and temperature, pH, and dissolved oxygen (DO), monitored in situ with a HACH HQ40d multiparameter probe.

4.2.2. *Reactor configuration and operation*

Two anaerobic structured-bed reactors (AnSTBRs) constructed from acrylic, designated R1 and R2, were used according to the configuration described by Blanco et al. (2017). Each reactor had a packed bed consisting of metal rods and low-density polyethylene (LPDE) cylinders (25 × 12 mm), with a working volume of 2.4 L (Figure 4.1). The structured-bed configuration was adopted because it combines surface area for

microbial attachment with a high void fraction, thereby promoting biomass retention and stability under continuous operation.



Figure 4.1 - Overview of the anaerobic structured-bed reactor (AnSTBR) used in the experiments

Throughout the experiment, the MBCB acted simultaneously as inoculum and substrate, allowing biomass conversion to occur through self-fermentation without the addition of an external inoculum. Accordingly, before continuous operation, raw MBCB was recirculated through the reactors at flow rate of 1.5 L h^{-1} for five days to promote the establishment of an anaerobic fermentative community (Del Pilar Anzola-Rojas et al., 2015). The reactors were then kept in a temperature-controlled incubator (BOD, model

411-4D, Ethik Technology, Brazil) at 25 °C, under dark conditions, and continuously fed with fresh MBCB collected from the HRAPs and stored for no longer than three days in independent reservoirs for each reactor.

The reactors were operated in parallel for 69 days under different organic loading rates (OLRs): 3 kg COD m⁻³ d⁻¹ (R1) and 5 kg COD m⁻³ d⁻¹ (R2). The selected OLRs were defined based on preliminary operational assessments and the COD concentration range of the MBCB produced in the HRAPs. Because of the relatively low and variable COD content of the biomass, applying higher OLRs would require excessively short hydraulic retention times (HRTs) to maintain continuous feeding, which could lead to kinetic limitations associated with insufficient contact time for hydrolysis and substrate conversion.

Owing to the intrinsic variability of biomass cultivated in wastewater under outdoor conditions, COD was measured daily according to American Public Health Association (2023), and the HRT was calculated and adjusted to maintain the predefined OLR in each reactor. The biomass collected from the HRAPs was simultaneously distributed between separate feed reservoirs for each reactor and stored for no longer than three days before being replaced with fresh material.

Finally, the influent pH was progressively reduced across three phases using 6 N HCl. This step was implemented as an operational strategy to promote acidogenic conditions during continuous operation. The experimental design is summarized in Table 4.1, whereas the influent and effluent pH monitoring data, including the pH after acidification, are provided in Tables 4.2 and 4.3.

Table 4.1. Experimental design of the AnSTBRs (R1 and R2).

Phase	Days	Influent pH	OLR R1 (kg COD m ⁻³ d ⁻¹)	OLR R2 (kg COD m ⁻³ d ⁻¹)
I	0–24	Not adjusted (6.9–9.5)	3	5
II	24–36	~5	3	5
III	36–69	~3	3	5

Table 4.2 - pH monitoring of reactor R1 during operation, showing influent and effluent values, including pH after acidification.

Day	Influent		Effluent
	pH	pH (after acidification)	pH
11	8.52	-	-
14	9.27	-	8.18
15	6.92	-	7.84
17	8.88	-	7.70
20	7.46	-	7.66
22	9.34	-	8.42
24	8.10	4.93	7.62
27	7.40	4.66	7.13
28	6.16	4.79	-
29	7.10	4.33	7.29
31	6.98	4.70	7.32
32	6.46	4.81	-
35	6.23	4.82	-
36	6.55	3.09	7.35
37	4.49	2.99	-
38	6.64	2.97	7.40
39	3.09	2.97	-
41	6.11	2.90	6.75
43	6.18	2.97	6.51
45	6.99	2.93	6.96
48	6.18	2.73	7.08
52	7.72	~3	6.95
55	6.32	2.97	6.63
57	6.25	2.88	5.14
62	6.95	2.87	3.66
64	6.12	2.96	6.76
66	6.90	3.07	6.81
69	-	-	6.81

Table 4.3 - pH monitoring of reactor R2 during operation, showing influent and effluent values, including pH after acidification.

Date	Influent		Effluent
	pH	pH (after acidification)	pH
11	8.34	-	-
14	8.56	-	8.64
15	7.71	-	7.80
17	8.88	-	7.32
20	7.51	-	7.64
22	9.49	-	8.63
24	7.69	5.01	7.77
27	7.35	4.97	7.40
28	6.97	4.78	7.32
29	6.90	4.32	-
31	6.48	5.00	7.32
32	6.79	4.85	-
35	6.37	4.61	-
36	6.45	3.03	7.12
37	3.89	2.99	-
38	3.17	2.98	7.27
39	3.89	2.97	-
41	6.00	2.94	6.58
43	6.08	2.95	6.41
45	6.60	2.96	6.57
48	6.09	2.94	6.64
52	7.46	2.98	6.67
55	6.35	2.89	6.26
57	6.32	2.92	5.80
62	6.77	2.94	3.42
64	6.68	2.96	-
66	6.92	3.11	-
69	-	-	5.10

4.2.3. Analytical methods

Biogas production was monitored daily with the low-cost meter described by Araujo & Oliveira (2024), and its composition was determined every two days by gas chromatography equipped with a thermal conductivity detector (GC/TCD; GC-2030, Shimadzu; Supelco Carboxen 1010 PLOT column), quantifying H₂, N₂, CH₄, and CO₂ according to Araujo et al. (2024). Gas samples were collected with 1000 µL gas-tight syringes.

Liquid-phase analyses were performed three times per week at the inlet and outlet of the reactors. COD (total and soluble) and nitrogen compounds (N-NO₃⁻, N-NH₄⁺ and TKN) were determined according to American Public Health Association (2023) ; carbohydrates by the phenol-sulfuric acid method (Dubois et al., 1956) ; and soluble metabolites (formic, citric, acetic, propionic, lactic, butyric, iso-butyric, levulinic, valeric, iso-valeric and caproic acids, in addition to furfural and 5-hydroxymethylfurfural) by high-performance liquid chromatography with a diode-array detector (HPLC-DAD), according to Silva et al. (2025) .

4.2.4. Microbial community analysis

At the end of the operational period, biomass was sampled from both reactors, comprising the biofilm attached to the LDPE support (Bed Zone, BDZ), the suspended cells (Feeding Chamber, FDC), and the inoculum (MBCB). After centrifugation and washing in phosphate-buffered saline, the pellets were stored at -20 °C until DNA extraction with the FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals, USA). The V3-V4 region of the 16S rRNA gene was amplified (primers 341F/806R) and paired-end sequenced on an Illumina NextSeq 2000 platform. Sequences were processed in R, with primer trimming, ASV inference and chimera removal by DADA2, taxonomic assignment against SILVA 138.2, and alpha- and beta-diversity analyses.

4.2.5. Calculations and data treatment

The OLR and HRT were calculated using the following equations (Eq. 1 and Eq. 2):

$$\text{OLR} = (Q \cdot \text{COD}_0)/V \quad (\text{Eq. 1})$$

$$\text{HRT} = V/Q \quad (\text{Eq. 2})$$

Where Q is the feed flow rate (L d^{-1}), COD_0 the influent COD concentration (g L^{-1}) and V the working volume of the reactor (L).

The removal efficiencies of COD, carbohydrates and nitrogen compounds were obtained by Eq. 3:

$$E (\%) = [(C_0 - C)/C_0] \times 100 \quad (\text{Eq. 3})$$

Where C_0 and C are the influent and effluent concentrations, respectively.

Gas volumes were normalized to standard temperature and pressure conditions (STP; 273.15 K and 1 atm).

Data are presented as mean $\pm$ standard deviation for each operational phase. Means and standard deviations were calculated in a spreadsheet, and no inferential statistical tests were performed; comparisons between reactors and operational phases are descriptive.

4.3. Results and discussion

4.3.1. *Effect of the applied organic loading rate and pH on reactor performance*

Despite influent acidification to pH 5 and 3, in Phases II and III, respectively, the mean effluent pH remained close to neutrality (R1: 6.9 ± 1.1 ; R2: 6.6 ± 1.9), indicating a strong internal buffering capacity within the reactors. This behavior was likely associated with alkalinity generation resulting from the reactions established within the reactors, as discussed in Section 3.1.2. Therefore, the acidification strategy did not establish the intended acidic conditions in the reaction medium.

The OLRs, in turn, were maintained throughout operation by daily HRT adjustments based on the influent COD, so that R1 and R2 operated under 3 and 5 $\text{kg COD m}^{-3} \text{ d}^{-1}$, respectively. Unlike the pH adjustment strategy, the intended loading conditions were successfully maintained, allowing a direct comparison of reactor performance under the two applied loads.

The HRTs resulting from this adjustment (15 ± 7.6 h in R1 and 9 ± 4.8 h in R2) were within the range reported for fixed- and structured-bed reactors targeting bioH₂ production, from 8 to 24 h (Blanco et al., 2019; Fuess et al., 2017; Niz et al., 2019). In an AnSTBR fed with vinasse, the longest HRT evaluated (19 h) provided the highest bio-H₂ yields and the greatest operational stability (Niz et al., 2019), whereas Blanco et al. (2019) obtained continuous bioH₂ production in an AnSTBR operated at 25 °C – the same configuration and temperature used in this study – under an HRT of 24 h. The applied hydraulic regime was therefore compatible with the pursuit of fermentative bioH₂ production in this reactor configuration, indicating that HRT was not a limiting factor for the absence of bioH₂.

4.3.1.1. Chemical oxygen demand (COD) and carbohydrates

The mean total COD removal efficiencies were $36 \pm 0.4\%$ (R1) and $31 \pm 0.61\%$ (R2). Occasional negative values, arising from effluent COD concentrations exceeding influent COD, likely reflected the washout of biologically derived particulate material retained in the bed, a phenomenon commonly observed in continuous systems fed with substrates containing high solids contents (Gonçalves et al., 2020), rather than net organic matter generation. Moreover, lower COD removals are expected in systems targeting bioH₂ production, because part of the organic matter is converted into microbial biomass and fermentative intermediates that remain in the effluent (Namdarimonfared et al., 2023). Under both OLRs, COD consumption remained within a similar range throughout operation (Table 4.4), consistent with the behavior reported for the anaerobic digestion of hydrochar derived from microalgal biomass, where the pattern has been attributed to microbial adaptation, sludge development and sorption processes (F. Wang et al., 2020).

Table 4.4. COD removal data for R1 and R2 during the experimental period

Days	R1		R2	
	COD removal (mg/L)	COD removal (%)	COD removal (mg/L)	COD removal (%)
14	1600,00	62,02%	1037,50	0,422
15	2018,75	84,16%	1375,00	0,781

Days	R1		R2	
	COD removal (mg/L)	COD removal (%)	COD removal (mg/L)	COD removal (%)
17	1144,375	64,27%	187,50	0,150
20	1125,00	50,88%	-	-
22	1400	77,03%	1075,00	0,852
24	812,5	39,30%	1006,25	0,375
27	975,625	41,86%	613,13	0,241
29	938,75	42,33%	381,25	0,187
31	2312,5	82,30%	2681,25	0,905
34	-237,5	-15,41%	-243,75	-0,155
36	2381,25	67,48%	2968,75	0,769
38	262,5	28,07%	62,50	0,071
41	650	38,01%	231,25	0,141
43	1450	66,17%	1206,25	0,596
45	93,75	4,44%	1168,75	0,650
48	-575	-66,86%	-881,25	-1,413
50	-	-	-	-
52	287,5	30,54%	700,00	0,584
54	431,25	71,43%	356,25	0,472
57	-231,25	-36,42%	-1037,50	-1,139
59	550	54,12%	531,25	0,495
62	206,25	12,76%	1281,25	0,801
64	-62,5	-5,66%	1031,25	0,802
Mean	762,34	36%	749,14	31%
Standard deviation (SD)	825,06	0,40	956,66	0,61

Carbohydrate conversion was $47 \pm 0.25\%$ (R1) and $48 \pm 0.33\%$ (R2), with mean influent concentrations of 55.28 and 53.48 mg L⁻¹ and effluent concentrations of 26.45 and 21.63 mg L⁻¹, respectively. These values reflect the low availability of soluble carbohydrates typical of MBCB and domestic sewage, especially when compared with agro-industrial feedstocks such as vinasse and soybean molasses, which may contain carbohydrate concentrations in the order of thousands of mg L⁻¹ (Anzola-Rojas et al., 2025; Augusto et al., 2025). Because fermentative bioH₂ production is directly associated with the availability of soluble sugars, the low concentration of readily fermentable compounds in the MBCB likely imposed limitations on fermentative conversion. The carbohydrate profiles (Figure 4.2) showed consistently low influent concentrations throughout the operational period. The observed fluctuations in carbohydrate concentration reflect the intrinsic variability of MBCB cultivated in wastewater, where organic compounds are embedded in a complex matrix formed during cultivation, making it impractical to attribute the carbohydrate fraction to a single isolated source. Furthermore, these influent variations cannot be related to the pH changes imposed on the system, since the analyzed samples were always collected before pH adjustment. Despite these fluctuations, both reactors consistently presented lower carbohydrate concentrations in the effluent than in the influent, indicating continuous utilization of the available fermentable fraction. Previous studies have shown that carbohydrates represent the most readily biodegradable fraction in anaerobic systems and strongly influence fermentative metabolism (Lian et al., 2025; X. Zhang et al., 2022). In the present study, the conversion of about half of the carbohydrates under both conditions is consistent with limitations of substrate accessibility and assimilation.

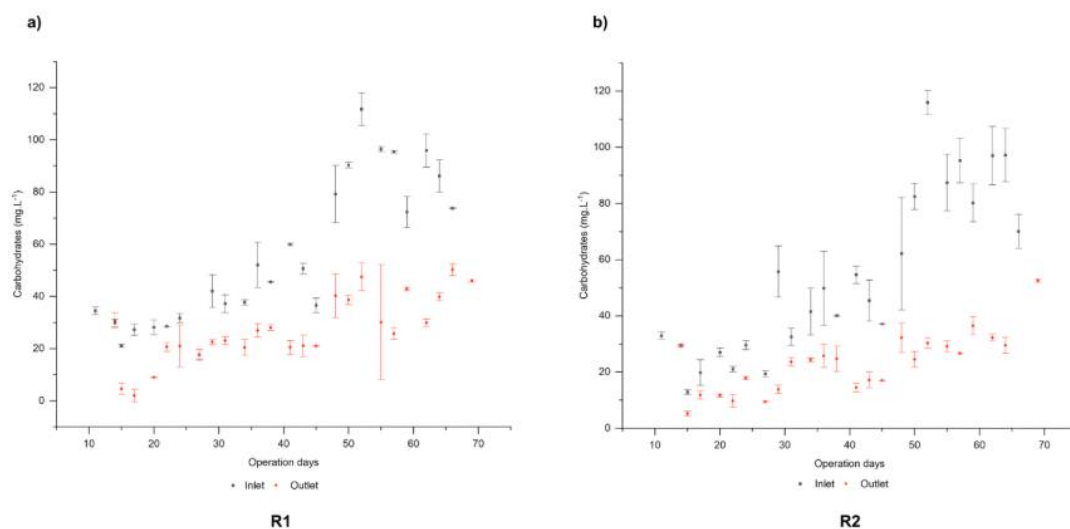


Figure 4.2. Carbohydrate concentration profiles (mg L⁻¹) in the influent and effluent during the operational period (day) in reactors R1 (a) and R2 (b).

4.3.1.2. Removal of nitrogen compounds

Both reactors exhibited high N-NO₃⁻ removal, ranging from 77% to 99%, accompanied by evidence of N-NH₄⁺ accumulation in the effluents, indicating active nitrate-reduction processes with direct implications for metabolic pathway selection. Nitrate reduction to N₂ was rapidly established and maintained under continuous operation (Figure 4.3): in Phases I and II the efficiencies were stable, suggesting good adaptation of the nitrate-reducing microorganisms to the MBCB and thermodynamically favorable conditions, even under acidification. After approximately 55 days, a transient decline was observed, probably caused by the additional stress imposed by pH reduction in Phase III, followed by rapid recovery in R1 and lower removal efficiencies in R2 until the end of monitoring. Even so, removal remained above 75%, demonstrating the resilience of the nitrate-reducing activity.

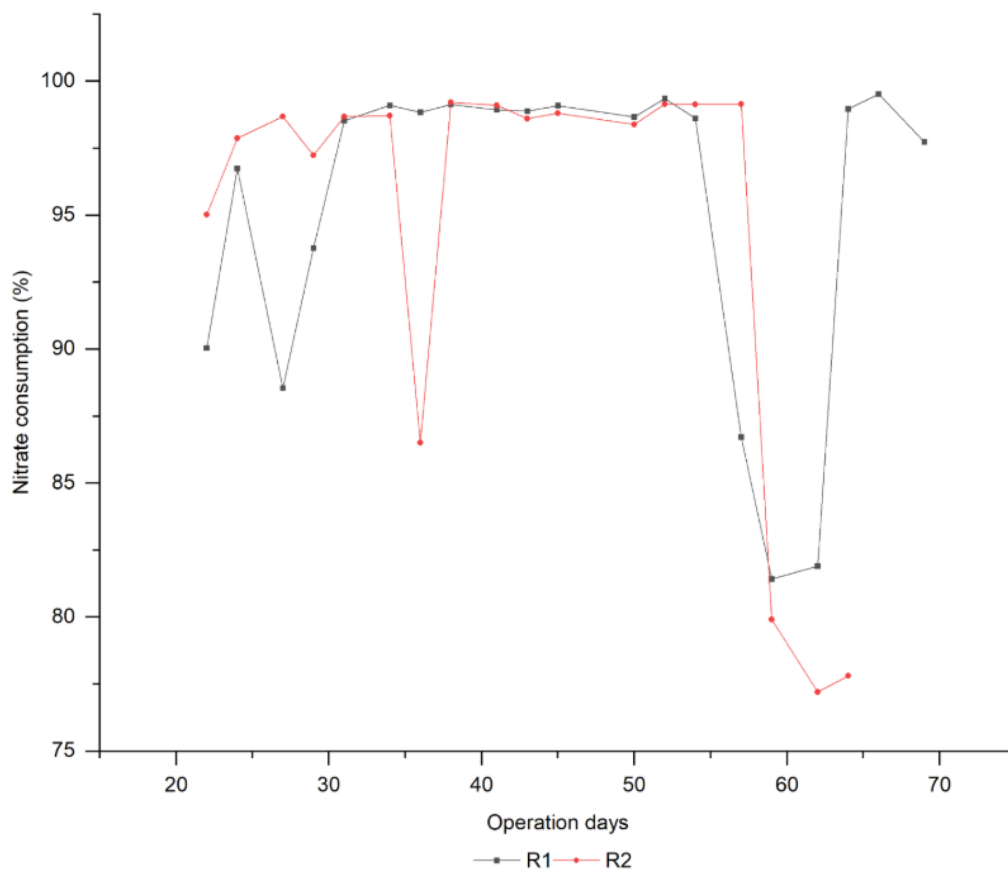
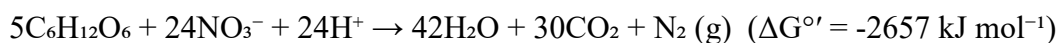


Figure 4.3. Nitrate removal profiles under different operational conditions during the operational period (day) in reactors R1 and R2.

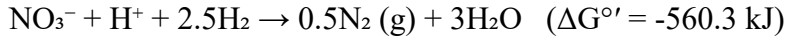
The removal of N-NO_3^- , the high N_2 fractions, and the evidence of N-NH_4^+ accumulation indicate the simultaneous occurrence of denitrification and protein degradation in the MBCB; high nitrate removals have also been reported during dark fermentation of nitrogen-rich substrates (Tang et al., 2022). The release of ammoniacal nitrogen may also have contributed to internal buffering (Walter et al., 2025), hindering the maintenance of the acidic conditions required for bioH_2 production. Thermodynamically, nitrate reduction is more favorable than both acidogenic and methanogenic pathways (Chernicharo, 2016), thereby diverting electrons from fermentative metabolism toward competing pathways. Equations 4–7 compare the main metabolic pathways and their standard Gibbs free energies (ΔG° ; pH 7, 25 °C, 1 atm):

Heterotrophic denitrification



(Eq. 4)

Autotrophic (hydrogenotrophic) denitrification



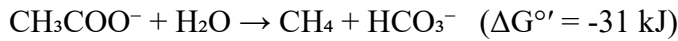
(Eq. 5)

Acidogenesis



(Eq. 6)

Methanogenesis (acetoclastic route)



(Eq. 7)

Barber & Stuckey (2000) estimated that the denitrification of 1 kg of nitrate requires approximately 0.645 kg of carbon, indicating that N-NO₃⁻ reduction tends to increase COD removal. This is consistent with the results observed in the present study, which showed high nitrate removal together with the organic matter removal discussed in Section 3.1.1, even in the absence of substantial CH₄ production. Denitrification may proceed through different pathways depending on the electron donor: in the heterotrophic route, organic compounds such as carbohydrates and VFAs act as electron donors, whereas in hydrogenotrophic denitrification, H₂ is directly consumed during nitrate reduction, thereby competing with fermentative H₂ production. In addition, dissimilatory nitrate reduction to ammonium (DNRA) may also have contributed to N-NH₄⁺ accumulation in the system. Together, these observations suggest that multiple nitrate-reduction pathways coexisted during reactor operation.

4.3.1.3. Biogas volume and composition

Biogas production differed markedly between the reactors under the applied operational conditions (Figure 4.4). Reactor 2 reached daily production peaks of nearly 300 mL d⁻¹ on days 40-41 and nearly 270 mL d⁻¹ on day 49, whereas R1 remained at low production throughout most of the operational period, with only a few measurements above 20 mL d⁻¹. In both reactors, the highest production peaks were recorded during

Phase III, after the influent pH was reduced to 3, indicating that acidification influenced the metabolic dynamics of the systems. Over the operational period, daily biogas production ranged from 1.83 to 57.72 mL d⁻¹ in R1 and from 1.14 to 298.63 mL d⁻¹ in R2. Under the applied operational regimes, the higher substrate loading resulted in greater gas production, reflecting restricted metabolic activity under low OLR.

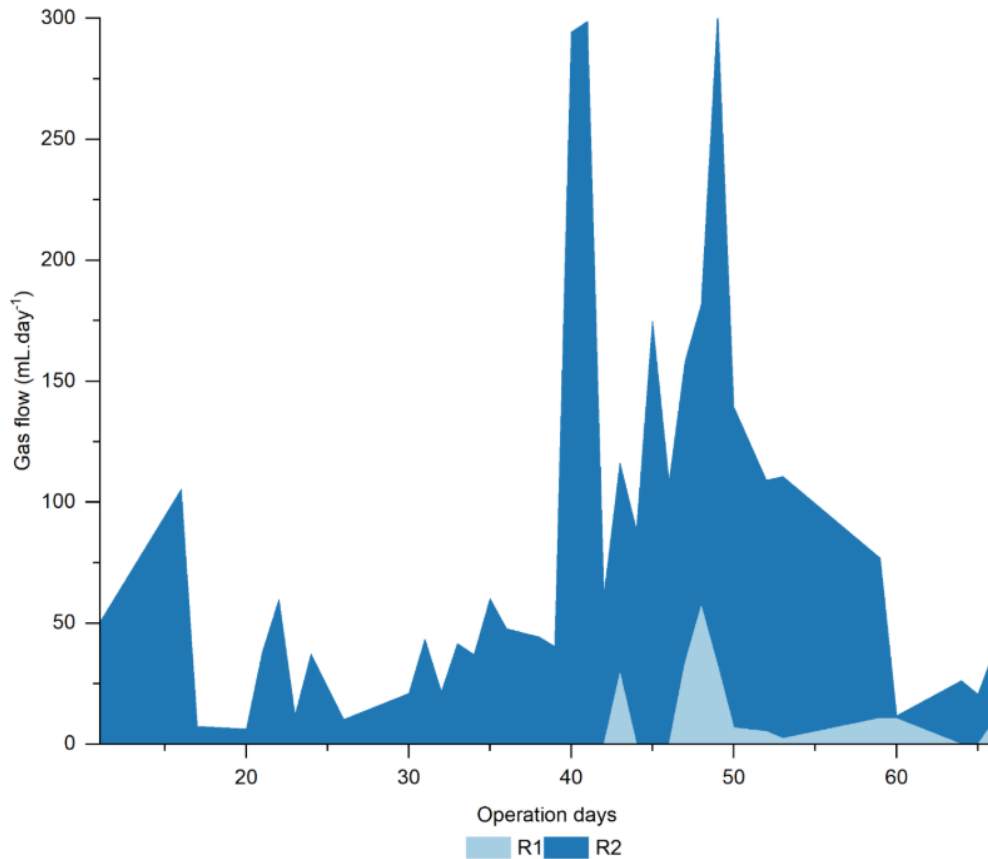


Figure 4.4. Daily biogas production (mL d⁻¹) in R1 and R2 during reactor operation.

N₂ was the predominant component in both reactors, with mean fractions of $87.67 \pm 6.00\%$ and $77.17 \pm 14.66\%$ for R1 and R2, respectively. CH₄ was detected throughout operation and its production was considered residual. CO₂ remained relatively low and stable in both systems, whereas bioH₂ was not detected under any of the tested conditions (Figure 4.5). The absence of detectable bioH₂ does not necessarily indicate the absence of acidogenesis but rather the lack of net H₂ accumulation within the system. Hydrolysis of microalgal biomass is frequently a limiting step because of the recalcitrance of the cell wall, which restricts the release of fermentable sugars when no pretreatment is applied (Silva et al., 2026). In addition, any bioH₂ produced during fermentation may

have been rapidly consumed by competing pathways, particularly hydrogenotrophic denitrification (Andalib et al., 2011). These mechanisms are consistent with the predominance of N_2 in the biogas, the high nitrate removal efficiencies and the near-neutral effluent pH observed during reactor operation.

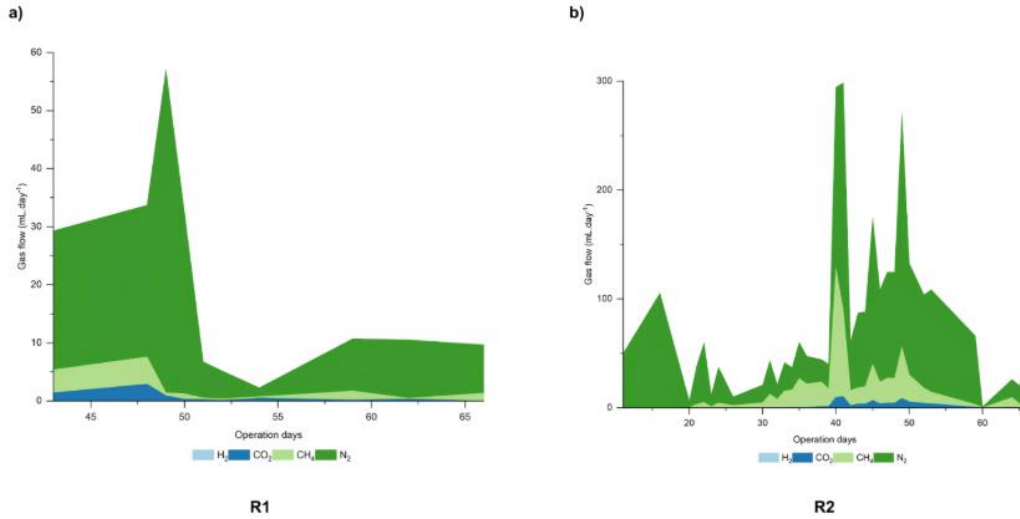


Figure 4.5. Temporal evolution of CH_4 , CO_2 and N_2 production ($mL d^{-1}$) during the operational period* (day) in reactors R1 (a) and R2 (b).

**Biogas composition data prior to day 40 are unavailable owing to operational failures in the gas sampling and analysis system in R1 during that period.*

Although the reactor conditions allowed some methanogenic activity, methane yields (MY) remained low throughout operation, with mean values of $0.34 mL CH_4 g^{-1} COD_{removed}$ in R1 and $3.30 mL CH_4 g^{-1} COD_{removed}$ in R2. These values were substantially lower than the stoichiometric methane yield of $350 mL CH_4 g^{-1} COD$, and also below the maximum yield of $79.2 \pm 3.1 mL CH_4 g^{-1} COD$ reported under mesophilic conditions using an inoculum adapted to microalgal biomass digestion (González-Fernández et al., 2013), reinforcing the interpretation that a large share of the available electrons and carbon was diverted to denitrification.

4.3.2. Soluble metabolite production

The VFA profiles obtained for both reactors are presented in Figure 4.6 and represent the mean concentrations of the acids measured in the influent and effluent, expressed in $mmol L^{-1}$. The concentrations of organic acids ($mmol L^{-1}$) in the influent

and effluent of reactors R1 and R2, together with the corresponding consumption and removal efficiencies, are detailed in Table 4.5.

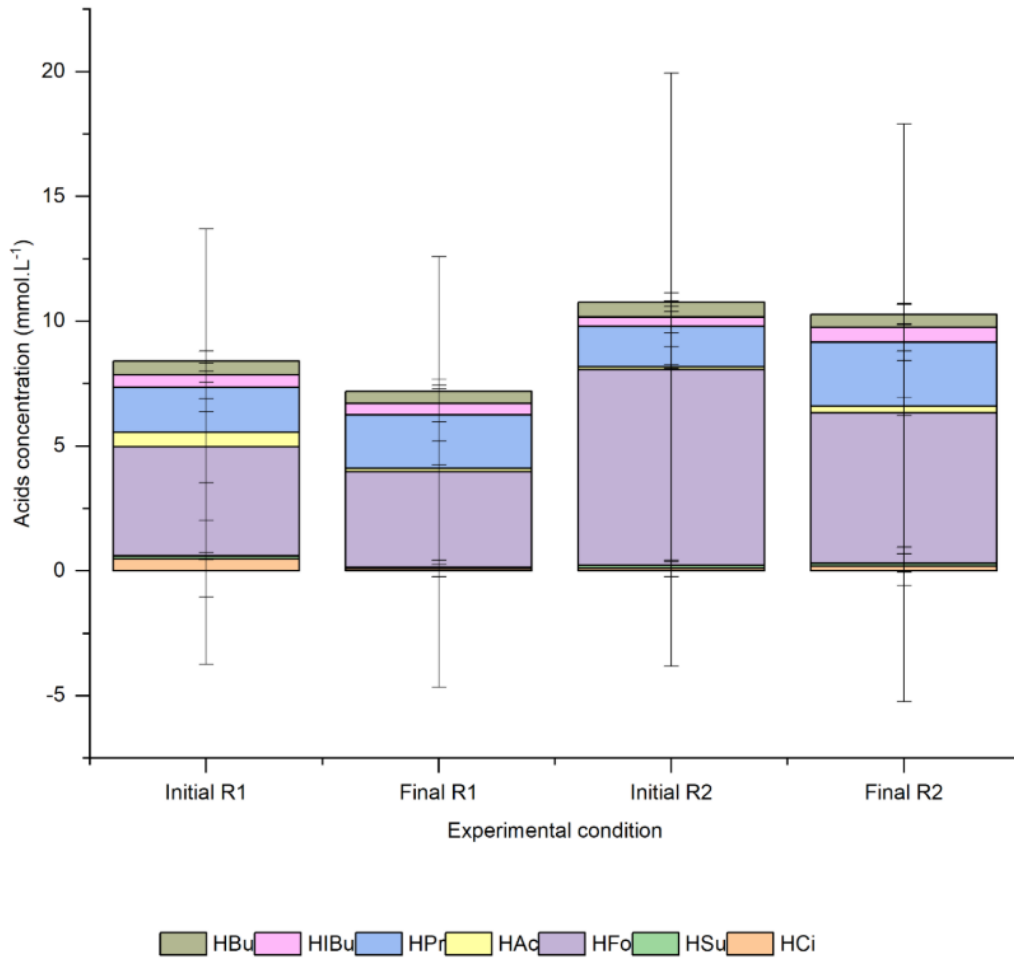


Figure 4.6. Mean concentrations of organic acids (mmol L⁻¹) measured at the inlet and outlet of reactors R1 and R2 at the initial and final stages of operation. Bars represent mean values, while error bars indicate the standard deviation. HBu: butyric acid; HIBu: isobutyric acid; HPr: propionic acid; HAc: acetic acid; HFo: formic acid; HSu: succinic acid; HCl: citric acid.

Table 4.5. Concentrations of organic acids (mM/L) in the influent and effluent of reactors R1 and R2, with the corresponding consumption and removal efficiency.

Organic Acid	Inffluent (mM/L)	Effluent (mM/L)	Removal efficiency	Inffluent (mM/L)	Effluent (mM/L)	Removal efficiency
HCl	0.481	0.094	80.44%	0.099	0.183	-85.00%
HSu	0.115	0.049	57.66%	0.127	0.132	-4.13%

Organic Acid	Inffluent (mM/L)	Effluent (mM/L)	Removal efficiency	Inffluent (mM/L)	Effluent (mM/L)	Removal efficiency
HLa	0.000	0.000	-	0.036	0.024	34.43%
HFo	4.373	3.826	12.50%	7.839	6.017	23.25%
HAc	0.577	0.148	74.39%	0.117	0.268	-129.41%
HPr	1.803	2.125	-17.89%	1.609	2.563	-59.27%
HIb	0.510	0.463	9.29%	0.379	0.595	-56.85%
HBu	0.546	0.495	9.35%	0.594	0.509	14.33%
HIv	0.029	0.007	76.41%	0.002	0.013	-447.06%
HVa	0.000	0.000	-	0.007	0.004	34.06%

Legend: influent – effluent (mM/L); Removal efficiency = (influent – effluent)/ influent (%); negative values indicate net production of the acid; "-" = not applicable (influent concentration = 0).

In R1, an overall apparent net consumption was observed mainly for formic (inlet mean: 4.37 mmol L⁻¹; outlet mean: 3.83 mmol L⁻¹), citric (inlet mean: 0.481 mmol L⁻¹; outlet mean: 0.094 mmol L⁻¹) and acetic acids (inlet mean: 0.577 mmol L⁻¹; outlet mean: 0.148 mmol L⁻¹), indicating that the system was able to metabolize intermediates typically associated with the acidogenic and acetogenic stages of anaerobic digestion. This behavior is consistent with the continuous turnover of these intermediates through downstream metabolic pathways, in which these compounds are gradually converted into more reduced products such as CH₄ (Li et al., 2017). Propionic acid, however, showed an apparent net production in R1 (inlet mean: 1.803 mmol L⁻¹; outlet mean: 2.125 mmol L⁻¹), a pattern associated with thermodynamic limitations affecting syntrophic acetogenic bacteria, since its oxidation to acetate and H₂ becomes energetically favorable only under extremely low H₂ partial pressures (Chernicharo, 2016). Under continuous operation, the coexistence of H₂-producing and H₂-consuming routes, combined with substrate limitation, may have restricted propionate conversion, contributing to the observed metabolic distribution and limiting the accumulation of gaseous products.

In R2, net production of propionic acid was also observed (inlet mean: 1.609 mmol L⁻¹; outlet mean: 2.563 mmol L⁻¹), accompanied by the formation of branched-chain VFAs such as isobutyric acid (inlet mean: 0.379 mmol L⁻¹; outlet mean: 0.595 mmol

L⁻¹) and acetate (inlet mean: 0.117 mmol L⁻¹; outlet mean: 0.268 mmol L⁻¹), indicating active fermentative metabolism. According to Chernicharo (2016), propionate conversion by syntrophic acetogenic bacteria is a metabolically sensitive step that strongly depends on low H₂ partial pressures. In systems where nitrate is available as a preferential electron acceptor, reducing equivalents may be preferentially directed to denitrification rather than to syntrophic propionate oxidation, limiting the activity of acetogenic bacteria and resulting in the accumulation of this intermediate. Even so, the apparent consumption of formic acid in R2 (7.839 to 6.017 mmol L⁻¹), also observed in R1, indicates partial progression towards downstream pathways: formate is a typical intermediate of acidogenesis and acetogenesis and can be used by hydrogenotrophic methanogens as an alternative to molecular H₂ under H₂-limited conditions (Li et al., 2017).

4.3.3. Microbial community structure and functional selection under different organic loading rates

The communities of the inoculum (MBCB) and of the FDC and BDZ compartments at the end of operation were analyzed by 16S rRNA gene sequencing. The diversity of the inoculum differed from that of the reactor communities (Figure 4.7), as expected during the transition from an aerobic phototrophic environment to an anaerobic, dark environment (Silva et al., 2025). Between the reactors, the Shannon index was numerically higher in R2, where the BDZ and FDC communities clustered together, suggesting that the higher OLR promoted greater microbial diversity and a more homogeneous distribution – probably because of the higher substrate availability and the larger particulate fraction of the biomass, which can promote adhesion on the particle surface Silva et al. (2025). Although reactor performance in terms of substrate removal and biogas production was generally similar, greater microbial diversity is often associated with an enhanced capacity to degrade complex substrates (Raczka et al., 2021) and greater resilience to operational fluctuations (Petriglieri et al., 2023; Pierangeli et al., 2026).

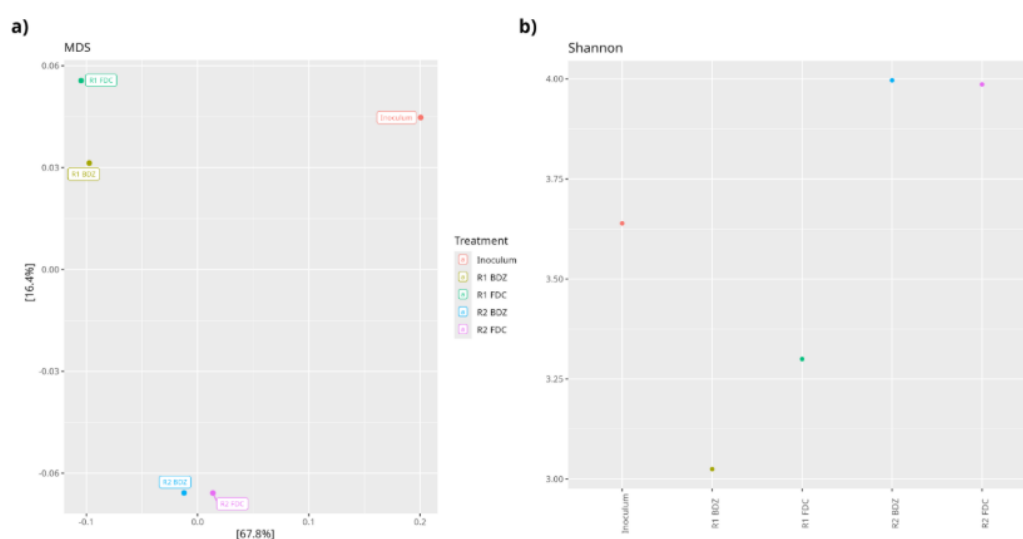


Figure 4.7. Shannon index (a) and Multidimensional Scaling (b) of the inoculum and of the compartments of R1 and R2 at the end of the operational period.

At the phylum level (Figure 4.8a), the inoculum was dominated by Pseudomonadota (60%) and Bacillota (24%), followed by Chloroflexota (4%), Patescibacteria (3.3%), Bacteroidota (3%), and Actinomycetota (1.7%) – taxa commonly associated with microalgal consortia that contribute to COD and nutrient removal (Pazo Vila et al., 2026; Pessi et al., 2022). Under continuous feeding and anaerobiosis, the reactors were predominantly composed of Pseudomonadota and Bacteroidota, followed by Bacillota, Spirochaetota, Acidobacteriota, and Actinomycetota (Figure 4.8a) – phyla associated with the hydrolytic and acidogenic stages of microalgal dark fermentation (Babich et al., 2024; Silva et al., 2025). Because Pseudomonadota includes many of the best-known denitrifying bacteria, while representatives capable of nitrate and nitrite reduction have also been reported in Bacteroidota, Bacillota and Actinobacteria (Pessi et al., 2022; Schacksen & Nielsen, 2024), and members of Acidobacteriota also possess genetic potential for these processes (Kristensen et al., 2021), the observed community composition is consistent with the hydrolytic, acidogenic, and nitrate-reducing activities observed in the reactors.

At the genus level (Figure 4.8b), the inoculum comprised taxa linked to nitrogen metabolism and fermentation: Erysipelothrix (14%), Pseudomonas (6.3%), Comamonadaceae (4%), and Saccharimonadales (4%). Erysipelothrix produces organic acids through carbohydrate fermentation and has been associated with improved

denitrification (Mielcarek et al., 2017; Verborg et al., 2004; M. Wang et al., 2025); Saccharimonadales has been associated with fermentation and partial denitrification (Babich et al., 2024; Zheng et al., 2024); and Pseudomonas and Comamonadaceae comprise microorganisms capable of denitrification and heterotrophic nitrification (J. Zhang et al., 2011). Rare ASVs (RA < 0.25%) dominated the inoculum (70%) and decreased throughout operation, indicating that the imposed conditions selected taxa that were previously present at low abundance. Among the 16 most abundant genera, both reactors selected hydrolytic, fermentative, and nitrate-reducing microorganisms, whose differences between reactors and compartments were reflected mainly in their relative abundances, likely associated with the distinct OLRs and growth environments (suspended – FDC; attached – BDZ).

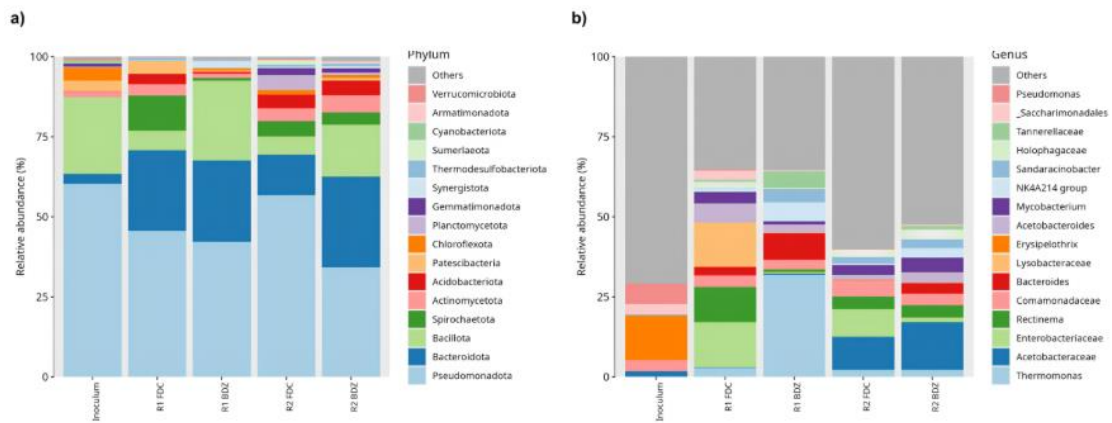


Figure 4.8. Taxonomic distribution according to 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis at the phylum (a) and genus (b) levels of the microbial community present in the inoculum and in the compartments of R1 and R2 at the end of the operational period.

In R1, the FDC was enriched in hydrolytic and fermentative microorganisms – Enterobacteriaceae (14%), Lysobacteraceae (14%), Rectinema (11%), Acetobacteroides (6%) and Comamonadaceae (6%), with Bacteroides, Mycobacterium, Saccharimonadales and Holophagaceae occurring at lower proportion. These taxa are commonly associated with carbohydrate fermentation to organic acids and H₂ (Enterobacteriaceae and Acetobacteroides, the latter a producer of acetate and H₂) and with the degradation of polysaccharides and proteins (Lysobacteraceae, Rectinema, Bacteroides) (Babich et al.,

2024; Do et al., 2025; Koelschbach et al., 2017; Kumar et al., 2019; Su et al., 2014; Yu et al., 2024; J. Zhang et al., 2015) . In the BDZ, attached growth favored the nitrate and nitrite-reducing genus *Thermomonas* (32%; Mergaert et al., 2003) , which, together with Comamonadaceae (3%) and Sandaracinobacter (4.3%) (Gumaelius et al., 2001; Khan et al., 2002; Lee et al., 2020) , likely contributed to nitrate reduction in the biofilm, where fermentative taxa such as *Bacteroides* (8.4%), the NK4A214 group (5.8%) and Tannerellaceae (5%) were also enriched in this compartment (Wei et al., 2022; Yu et al., 2024) . Overall, these results suggest that hydrolysis and fermentation predominated in the FDC – releasing organic acids and H₂ - whereas nitrate reduction was concentrated in the BDZ.

In R2, Acetobacteraceae were enriched in both compartments (10% in the FDC; 15% in the BDZ). Although its cultivable members are aerobic acetate producers, the presence of genes associated with denitrification (*nirK* and *nosZ* genes) has been reported for this family (Pessi et al., 2022) , suggesting that its members may have contributed substantially to nitrate reduction in R2, together with Comamonadaceae, Holophagaceae and Sandaracinobacter, which occurred at similar abundance in both compartments. Hydrolysis and fermentation taxa included *Rectinema* and Enterobacteriaceae in the FDC, and *Rectinema*, *Bacteroides*, *Acetobacteroides* and the NK4A214 group in BDZ, with similar abundances between compartments – possibly because of the higher loading in R2, which likely supported these metabolisms throughout the reactor, including the BDZ.

Methanosarcina was the only methanogenic archaeon restricted to the BDZ of both reactors (0.45% in R1; 0.35% in R2). Although the reactors were not operated under conditions intended to promote methanogenesis, the production of acetate and potentially H₂, combined with the attached-growth configuration – which prevents cell washout and promotes closer spatial association between syntrophic partners (Fuess et al., 2017) – likely supported the persistence of this genus and is consistent with the residual methane detected during reactor operation.

Overall, the applied OLRs, reactor configuration, and continuous feeding favored the selection of hydrolytic, fermentative and nitrate-reducing bacteria and of methanogenic archaea autochthonous to the MBCB. These findings demonstrate that

wastewater-derived MBCB can sustain diverse anaerobic microbial communities, supporting its valorization as a renewable feedstock within circular economy strategies.

4.4. Conclusion

This study evaluated the continuous anaerobic processing of MBCB cultivated in domestic wastewater in AnSTBRs operated under different OLRs and influent pH values. Fermentative bioH₂ production was not established under any of the evaluated regimes; instead, nitrate reduction emerged as the dominant metabolic route. This behavior was governed by intrinsic characteristics of the substrate, particularly the low availability of readily fermentable carbohydrates and the high nitrogen content. Although influent acidification influenced gas production dynamics, internal buffering and competing electron-consuming pathways prevented the establishment of the conditions required for sustained bioH₂ production, whereas increasing the OLR enhanced gas production without altering the predominance of nitrate reduction. Overall, these findings demonstrate that operational strategies alone are insufficient to overcome the limitations imposed by the composition of biomass.

Nevertheless, the high N-NO₃⁻ removal efficiencies (77–99%) highlight the primary practical implication of the system: the anaerobic processing of MBCB has the potential to serve as a complementary nitrogen-removal step in integrated wastewater treatment and nutrient recovery strategies, thereby transforming what is a limitation for fermentative bioH₂ production into a valuable treatment function.

To steer the biomass towards fermentation, the results suggest approaches such as two-stage anaerobic configurations, which separate denitrification from the acidogenic and methanogenic stages, as well as strategies to increase the availability of fermentable substrates, including pretreatment, C/N ratio adjustment, and cultivation conditions that favor carbohydrate accumulation. Together, these approaches could promote more effective metabolic pathway selection and enhance resource recovery in continuous anaerobic systems fed with MBCB.

References

American Public Health Association, A. W. W. A. W. E. Federation. L. W. B.-H. E. B. T. eds. (2023). *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater* (APHA Press, Ed.; 24th ed.).

Andalib, M., Nakhla, G., McIntee, E., & Zhu, J. (2011). Simultaneous denitrification and methanogenesis (SDM): Review of two decades of research. In *Desalination* (Vol. 279, Numbers 1–3, pp. 1–14). <https://doi.org/10.1016/j.desal.2011.06.018>

Anzola-Rojas, M. del P., Sánchez, F. E., Fuess, L. T., Pozzi, E., Nolasco, M. A., De Wever, H., Pant, D., & Zaiat, M. (2025). Hydrogen production from fermented sugarcane vinasse and its utilization by biosynthesis processes in a single-chambered microbial electrolysis cell. *International Journal of Hydrogen Energy*, 100, 49–57. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2024.12.308>

Araujo, M. N., & Oliveira, G. H. D. (2024). A low-cost, open-source gas flow meter for laboratory-scale bioreactors. *Flow Measurement and Instrumentation*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.flowmeasinst.2024.102651>

Araujo, M. N., Vargas, S. R., Soares, L. A., Trindade, L. F., Fuess, L. T., & Adorno, M. A. T. (2024). Rapid method for determination of biogas composition by gas chromatography coupled to a thermal conductivity detector (GC-TCD). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 104(20), 8690–8707.

Augusto, I. M. G., Lazaro, C. Z., Albanez, R., Ratusznei, S. M., Lovato, G., & Rodrigues, J. A. D. (2025). Optimizing thermophilic dark fermentation of soybean molasses: The critical role of temperature in maximizing biohydrogen production. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(5). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.117804>

Babich, O., Ivanova, S., Michaud, P., Budenkova, E., Kashirskikh, E., Anokhova, V., & Sukhikh, S. (2024). Fermentation of micro- and macroalgae as a way to produce value-added products. In *Biotechnology Reports* (Vol. 41). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2023.e00827>

Barber, W. P., & Stuckey, D. C. (2000). *NITROGEN REMOVAL IN A MODIFIED ANAEROBIC BAFFLED REACTOR (ABR): 1, DENITRIFICATION*. Retrieved www.elsevier.com/locate/watres

Blanco, V. M. C., Fuess, L. T., & Zaiat, M. (2017). Calcium dosing for the simultaneous control of biomass retention and the enhancement of fermentative biohydrogen production in an innovative fixed-film bioreactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(17), 12181–12196. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.180>

Blanco, V. M. C., Oliveira, G. H. D., & Zaiat, M. (2019). Dark fermentative biohydrogen production from synthetic cheese whey in an anaerobic structured-bed reactor: Performance evaluation and kinetic modeling. *Renewable Energy*, 139, 1310–1319. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.03.029>

Cavalcante, W. A., de Menezes, C. A., da Silva Júnior, F. C. G., Gehring, T. A., Leitão, R. C., & Zaiat, M. (2023). From start-up to maximum loading: An approach for methane production in upflow anaerobic sludge blanket reactor fed with the liquid fraction of fruit and vegetable waste. *Journal of Environmental Management*, 335. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2023.117578>

Chernicharo, C. A. L. (2016). *Princípios do tratamento biológico de águas residuárias* (UFMG, Ed.; 2nd ed.). UFMG.

Del Pilar Anzola-Rojas, M., Da Fonseca, S. G., Da Silva, C. C., De Oliveira, V. M., & Zaiat, M. (2015). The use of the carbon/nitrogen ratio and specific organic loading rate as tools for improving biohydrogen production in fixed-bed reactors. *Biotechnology Reports*, 5(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2014.10.010>

Do, J. M., Jo, S. W., Yeo, H. T., Hong, J. W., & Yoon, H. S. (2025). Substrate-Driven Microbial Dynamics and Digestate Traits in Microalgal Co-Digestion. *Waste and Biomass Valorization*. <https://doi.org/10.1007/s12649-025-03385-y>

Dubois, M., et al. (1956). Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical Chemistry*, 28(3), 350–356.

Ferreira, J., Silva, T. A., Pereira, A. S. A. de P., Reis, A. J. D. dos, Zaiat, M., & Calijuri, M. L. (2025). Modulating microalgal metabolism and its integration into dark fermentation: Challenges and opportunities with wastewater-grown biomass. In *Science of the Total Environment* (Vol. 1002). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2025.180546>

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>

Ganesh Saratale, R., Kumar, G., Banu, R., Xia, A., Periyasamy, S., & Dattatraya Saratale, G. (2018). A critical review on anaerobic digestion of microalgae and macroalgae and co-digestion of biomass for enhanced methane generation. In *Bioresource Technology* (Vol. 262, pp. 319–332). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2018.03.030>

Gonçalves, R. F., Assis, T. I., Maciel, G. B., Borges, R. M., & Cassini, S. T. A. (2020). Co-digestion of municipal wastewater and microalgae biomass in an upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Algal Research*, 52. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.102117>

González-Fernández, C., Sialve, B., Bernet, N., & Steyer, J. P. (2013). Effect of organic loading rate on anaerobic digestion of thermally pretreated *Scenedesmus* sp. biomass. *Bioresource Technology*, 129, 219–223. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.123>

Greses, S., Jimenez, J., González-Fernández, C., & Steyer, J. P. (2024). Modelling of anaerobic digestion of microalgae biomass: Effect of overloading perturbation. *Bioresource Technology*, 399. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2024.130625>

Gumaelius, L., Magnusson, G., Pettersson, B., & Dalhammar, G. (2001). *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. In *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* (Vol. 51).

Hidaka, T., Nguyen, T. H., Togari, T., Takashima, M., & Shigemura, H. (2025). A review of sewage sludge digestion technologies in Japan: from technological evolution to global perspectives. In *Journal of Material Cycles and Waste Management* (Vol. 27, Number 5, pp. 2779–2800). Springer. <https://doi.org/10.1007/s10163-025-02281-w>

Khan, S. T., Horiba, Y., Yamamoto, M., & Hiraishi, A. (2002). Members of the family Comamonadaceae as primary poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate)-degrading denitrifiers in activated sludge as revealed by a polyphasic approach. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3206–3214. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.7.3206-3214.2002>

Koelschbach, J. S., Mouttaki, H., Pickl, C., Heipieper, H. J., Rache, R., Lawson, P. A., & Meckenstock, R. U. (2017). *Rectinema cohabitans* gen. nov., sp. nov., a rod-shaped spirochaete isolated from an anaerobic naphthalene-degrading enrichment culture. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(5), 1288–1295. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001799>

Kristensen, J. M., Singleton, C., Clegg, L. A., Petriglieri, F., & Nielsen, P. H. (2021). High Diversity and Functional Potential of Undescribed “Acidobacteriota” in Danish Wastewater Treatment Plants. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643950>

Kumar, S., Bansal, K., Patil, P. P., & Patil, P. B. (2019). Phylogenomics insights into order and families of Lysobacterales. *Access Microbiology*, 1(2). <https://doi.org/10.1099/acmi.0.000015>

Lee, I., Jang, G. Il, Cho, Y., Yoon, S. J., Pham, H. M., Nguyen, A. V., Lee, Y. M., Park, H., Rhee, T. S., Kim, S. H., & Hwang, C. Y. (2020). *Sandaracinobacter neustonicus* sp. Nov., isolated from the sea surface microlayer in the southwestern pacific ocean, and emended description of the genus sandaracinobacter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(8), 4698–4698. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004333>

Li, R., Duan, N., Zhang, Y., Liu, Z., Li, B., Zhang, D., & Dong, T. (2017). Anaerobic co-digestion of chicken manure and microalgae *Chlorella* sp.: Methane potential, microbial diversity and synergistic impact evaluation. *Waste Management*, 68, 120–127. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.06.028>

Lian, T., Yin, F., Cao, Q., Zhou, T., Zhang, F., Sun, J., Cai, Y., & Dong, H. (2025). Enhancing lactic acid production by organic loading rate regulation during anaerobic co-fermentation: Insights into metabolic and bacterial responses. *Environmental Technology and Innovation*, 40. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2025.104525>

Mergaert, J., Cnockaert, M. C., & Swings, J. (2003). *Thermomonas fusca* sp. nov. and *Thermomonas brevis* sp. nov., two mesophilic species isolated from a denitrification reactor with poly(E-caprolactone) plastic granules as fixed bed, and emended description of the genus *Thermomonas*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(6), 1961–1966. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02684-0>

- Mielcarek, A., Rodziewicz, J., Janczukowicz, W., Dabrowska, D., Ciesielski, S., Thornton, A., & Struk-Sokołowska, J. (2017). Citric acid application for denitrification process support in biofilm reactor. *Chemosphere*, 171, 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.099>
- Namdarimonfared, M., Zilouei, H., & Tondro, H. (2023). Biological hydrogen production from paper mill effluent via dark fermentation in a packed bed biofilm reactor. *Fuel*, 338. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2022.127231>
- Niz, M. Y. K., Etchelet, I., Fuentes, L., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2019). Extreme thermophilic condition: An alternative for long-term biohydrogen production from sugarcane vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(41), 22876–22887. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.07.015>
- Pazo Vila, Á., Norsker, N. H., Gernaey, K. V., & Huusom, J. K. (2026). A fluxomic model of microalgae photoautotrophic growth for application in industrial photobioreactors. *Algal Research*, 93. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.104440>
- Pessi, I. S., Viitamäki, S., Virkkala, A. M., Eronen-Rasimus, E., Delmont, T. O., Marushchak, M. E., Luoto, M., & Hultman, J. (2022). In-depth characterization of denitrifier communities across different soil ecosystems in the tundra. *Environmental Microbiomes*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s40793-022-00424-2>
- Petriglieri, F., Kondrotaitė, Z., Singleton, C., Nierychlo, M., Dueholm, M. K. D., & Nielsen, P. H. (2023). A comprehensive overview of the Chloroflexota community in wastewater treatment plants worldwide. *MSystems*, 8(6). <https://doi.org/10.1128/msystems.00667-23>
- Pierangeli, G. M. F., Saia, F. T., Del Nery, V., Damianovic, M. H. R. Z., Pozzi, E., de Araújo, M. M., & Gregoracci, G. B. (2026). Microbial Responses to the Physicochemical Properties and Reactor's Operational Parameters in Vinasse Digestion in a Pilot-Scale Hybrid Anaerobic Reactor. *Bioenergy Research*, 19(1). <https://doi.org/10.1007/s12155-025-10950-9>
- Raczka, N. C., Piñeiro, J., Tfaily, M. M., Chu, R. K., Lipton, M. S., Pasa-Tolic, L., Morrissey, E., & Brzostek, E. (2021). Interactions between microbial diversity and

substrate chemistry determine the fate of carbon in soil. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-97942-9>

Schacksen, P. S., & Nielsen, J. L. (2024). Unraveling the genetic potential of nitrous oxide reduction in wastewater treatment: insights from metagenome-assembled genomes. *Applied and Environmental Microbiology*, 90(9). <https://doi.org/10.1128/aem.02177-23>

Silva, T. A., de Araujo, M. N., de Rezende, E. G. F., Saia, F. T., Magalhães, I. B., de Paula Pereira, A. S. A., Ferreira, J., Gregoracci, G. B., Tallarico Adorno, M. Â., Fuess, L. T., Zaiat, M., & Calijuri, M. L. (2025). Biohydrogen production from wastewater-grown microalgae-bacteria consortia: Optimizing inoculum selection for enhanced yield. *Renewable Energy*, 247. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2025.123079>

Silva, T. A., de Jesus Junior, M. M., de Araujo, M. N., de Castro, L. S., Fuess, L. T., de Ávila Rodrigues, F., Zaiat, M., dos Reis, A. J. D., & Calijuri, M. L. (2026). Enhancing microalgal biohydrogen production: Unlocking higher yields with hydrothermal pretreatment with niobium phosphate. *Renewable Energy*, 259. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2025.125048>

Singh, H., Rout, S., & Das, D. (2022). Dark fermentative biohydrogen production using pretreated *Scenedesmus obliquus* biomass under an integrated paradigm of biorefinery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 47(1), 102–116. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2021.10.018>

Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 36, Number 13, pp. 7460–7478). <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>

Su, X. L., Tian, Q., Zhang, J., Yuan, X. Z., Shi, X. S., Guo, R. B., & Qiu, Y. L. (2014). *Acetobacteroides hydrogenigenes* gen. nov., Sp. nov., An anaerobic hydrogen-producing bacterium in the family Rikenellaceae isolated from a reed swamp. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 64, 2986–2991. <https://doi.org/10.1099/ij.s.0.063917-0>

Tang, T., Chen, Y., Liu, M., Du, Y., & Tan, Y. (2022). Effect of pH on the performance of hydrogen production by dark fermentation coupled denitrification. *Environmental Research*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112663>

Verbarg, S., Rheims, H., Emus, S., Frühling, A., Kroppenstedt, R. M., Stackebrandt, E., & Schumann, P. (2004). *Erysipelothrix inopinata* sp. nov., isolated in the course of sterile filtration of vegetable peptone broth, and description of Erysipelotrichaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 54(1), 221–225. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.02898-0>

Walter, J. M., Greses, S., Hagen, L. H., Schiml, V. C., Pope, P. B., González-Fernández, C., & Arntzen, M. Ø. (2025). Anaerobic digestion of microalgae: microbial response and recovery after organic loading disturbances. *MSystems*, 10(3). <https://doi.org/10.1128/msystems.01674-24>

Wang, F., Wang, J., Li, Z., Zan, S., & Du, M. (2020). Promoting anaerobic digestion by algae-based hydrochars in a continuous reactor. *Bioresource Technology*, 318. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124201>

Wang, M., Liu, K., Li, Q., Li, Y., Peng, H., Wang, Q., Wang, M., & Li, W. (2025). Microbial mechanism for improving biogas production performance from boiling acidified pig manure feedstock. *Bioresource Technology*, 419. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132104>

Wei, X., Ouyang, K., Long, T., Liu, Z., Li, Y., & Qiu, Q. (2022). Dynamic Variations in Rumen Fermentation Characteristics and Bacterial Community Composition during In Vitro Fermentation. *Fermentation*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/fermentation8060276>

Yu, B., Lu, Z., Zhong, S., & Cheong, K. L. (2024). Exploring potential polysaccharide utilization loci involved in the degradation of typical marine seaweed polysaccharides by *Bacteroides thetaiotaomicron*. *Frontiers in Microbiology*, 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1332105>

Zhang, J., Guo, R. B., Qiu, Y. L., Qiao, J. T., Yuan, X. Z., Shi, X. S., & Wang, C. S. (2015). Bioaugmentation with an acetate-type fermentation bacterium *Acetobacteroides hydrogenigenes* improves methane production from corn straw. *Bioresource Technology*, 179, 306–313. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.12.022>

Zhang, J., Wu, P., Hao, B., & Yu, Z. (2011). Heterotrophic nitrification and aerobic denitrification by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* YZN-001. *Bioresource Technology*, 102(21), 9866–9869. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.07.118>

Zhang, X., Jiao, P., Wang, Y., Wu, P., Li, Y., & Ma, L. (2022). Enhancing methane production in anaerobic co-digestion of sewage sludge and food waste by regulating organic loading rate. *Bioresource Technology*, 363. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127988>

Zheng, R., Zhang, K., Kong, L., & Liu, S. (2024). Research progress and prospect of low-carbon biological technology for nitrate removal in wastewater treatment. In *Frontiers of Environmental Science and Engineering* (Vol. 18, Number 7). Higher Education Press Limited Company. <https://doi.org/10.1007/s11783-024-1840-3>

5. CAPÍTULO II: DIGESTÃO ANAERÓBIA COMO ROTA DE VALORIZAÇÃO DE BIOMASSA DE MICROALGAS CULTIVADAS EM ÁGUAS RESIDUÁRIAS: UMA PERSPECTIVA ECONÔMICA E AMBIENTAL

Resumo: A digestão anaeróbia tem sido amplamente empregada no tratamento de resíduos orgânicos, com potencial para recuperação de energia e valorização de biomassa. Nesse contexto, o presente estudo avaliou a viabilidade econômica e ambiental do uso de um reator anaeróbio contínuo no tratamento e na valorização de biomassa microalgal-bacteriana (BMB) oriunda de águas residuárias (AR), considerando a produção de biogás como um coproduto do processo. Embora o sistema tenha sido inicialmente direcionado à produção fermentativa de hidrogênio (H_2), a operação contínua do reator evidenciou a predominância de rotas metabólicas associadas à desnitrificação e à metanogênese, com produção de metano em níveis mínimos. A análise foi conduzida com base em dados experimentais primários, complementados por simulação do processo no Aspen Plus, permitindo a caracterização dos fluxos de massa e energia do sistema. Os resultados indicaram baixa conversão da matéria orgânica da BMB em biogás, com predominância de nitrogênio gasoso (N_2) na corrente gasosa e limitada recuperação energética. A análise econômica demonstrou que, embora o aumento de escala reduza significativamente o preço mínimo de venda (PMV) do biogás, a viabilidade econômica do processo é fortemente limitada pelo baixo rendimento de conversão energética observado. A Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) revelou um desempenho ambiental globalmente favorável, com benefícios líquidos em todas as categorias de impacto avaliadas, fortemente influenciados pelos créditos ambientais associados ao uso de águas residuárias e à recuperação de recursos na etapa de produção da biomassa. De forma geral, os resultados indicam que, nas condições avaliadas, o reator anaeróbio contínuo desempenha um papel mais relevante na integração de serviços ambientais associados ao manejo da BMB, no âmbito do saneamento e da economia circular, do que na geração efetiva de energia, permanecendo a intensificação da recuperação energética como uma perspectiva para estudos futuros.

Palavras-chave: Biorrefinaria anaeróbia; Biomassa microalgal-bacteriana; Avaliação de ciclo de vida; Análise de viabilidade econômica; Recuperação de recursos.

5.1. Introdução

Processos biológicos capazes de converter resíduos e efluentes em energia representam uma estratégia consolidada para integrar o tratamento ambiental e a produção de bioenergia em um único sistema (Chrispim, Scholz e Nolasco, 2021). Nesse contexto, diante da crescente busca por fontes energéticas mais sustentáveis, a digestão anaeróbia (DA) de biomassa residual tem se destacado como uma opção consolidada e tecnicamente viável, apresentando elevado potencial de aplicação em sistemas descentralizados e integrados à infraestrutura de saneamento (Tsapekos et al., 2018; Ruales et al., 2025).

A DA ocorre por meio de uma sequência de etapas metabólicas interdependentes, com destaque para a acidogênese e a metanogênese, responsáveis pela conversão da matéria orgânica em produtos de interesse energético. Na fase acidogênica, compostos orgânicos complexos são convertidos em ácidos graxos voláteis (AGVs), alcoóis, dióxido de carbono (CO_2) e hidrogênio (H_2), enquanto a metanogênese promove a transformação desses intermediários, principalmente acetato, H_2 e CO_2 , em metano (CH_4). O balanço entre essas rotas metabólicas influencia diretamente o perfil dos produtos formados, a eficiência de remoção da matéria orgânica e o potencial de recuperação energética do processo (Budianto et al., 2025).

Tecnologias como os reatores anaeróbios de leito estruturado destacam-se como alternativas eficientes para a operação contínua de sistemas anaeróbios, principalmente por apresentar disposição ordenada do material suporte em seu interior, o que aumenta a superfície de contato entre microrganismos e substrato, e favorece a retenção de biomassa e a estabilidade operacional, mantendo um elevado índice de vazios. Essa configuração apresenta menor sensibilidade a variações de pH, temperatura e carga orgânica volumétrica (COV), além de reduzir a demanda energética do sistema, uma vez que dispensa a expansão do leito e elevados esforços de bombeamento (Fuess et al., 2017). Como resultado, esses reatores favorecem a conversão da matéria orgânica com menor consumo energético auxiliar, ampliando o potencial de recuperação de energia na forma de biogás.

Embora a configuração do reator seja determinante para o desempenho da DA, as características do substrato tratado exercem papel central na eficiência da conversão e na produção dos gases de interesse. Nesse contexto, biomassas residuais com composição

complexa têm despertado crescente interesse como substratos para a DA, especialmente quando associadas a estratégias de valorização de recursos (Barbera, Bertucco e Kumar, 2018). Nesse contexto, a biomassa microalgal-bacteriana (BMB) cultivada em águas residuárias tem sido investigada como um substrato promissor para esse fim, possibilitando ainda vantagens relacionadas ao tratamento, uma vez que permite a conversão da matéria orgânica em H_2 ou CH_4 , ao mesmo tempo em que promove a estabilização do resíduo (Martín et al., 2018). O desempenho desse processo é fortemente dependente das condições operacionais adotadas, como pH, tempo de retenção hidráulica, COV e configuração do reator, as quais influenciam diretamente o equilíbrio entre as diferentes etapas metabólicas da DA e a estabilidade do sistema (Zamanian, Askaripour e Rashtchian, 2026).

Embora a DA da BMB venha sendo investigada, ainda são limitados os estudos que integram avaliações ambientais e econômicas baseadas em dados experimentais primários de sistemas operados em regime contínuo. Do ponto de vista ambiental e econômico, a avaliação de sistemas anaeróbios voltados à recuperação de recursos deve considerar, além da viabilidade técnica, também as viabilidades econômica e ambiental do processo. Nesse sentido, a Avaliação do Ciclo de Vida (ACV) tem sido amplamente utilizada para quantificar impactos ambientais associados a rotas de produção de bioenergia, permitindo identificar trade-offs, hotspots ambientais e oportunidades de otimização ao longo do sistema (Baidoo et al., 2025). Da mesma forma, análises econômicas baseadas em dados operacionais primários são consideradas essenciais para avaliar a viabilidade de integração desses processos em cadeias produtivas existentes, especialmente no contexto do saneamento ambiental (Elgarahy et al., 2025).

A utilização de dados primários em regimes contínuos representa um diferencial relevante em estudos de ACV e avaliação econômica, uma vez que reduz incertezas associadas a premissas teóricas ou dados secundários (Strazza et al., 2016). Parâmetros como vazões, composições das correntes de entrada e saída, consumo energético dos equipamentos e produção efetiva de biogás permitem a construção de balanços de massa e energia representativos do processo em operação, aumentando a robustez das análises ambientais e econômicas subsequentes (Muradin, Joachimiak-Lechman e Foltynowicz, 2018; Ruiz et al., 2018).

Diante desse contexto, o presente estudo avalia a viabilidade econômica e ambiental do uso de um reator anaeróbio contínuo no tratamento e na valorização de BMB oriunda de águas residuárias, considerando a produção de biogás como um coproduto do processo. Embora o direcionamento inicial do sistema tenha sido a produção fermentativa de H_2 , a operação contínua do reator evidenciou a predominância de rotas metabólicas associadas à desnitrificação e à metanogênese, ainda que com produção de CH_4 em níveis mínimos. Assim, a análise baseia-se em dados operacionais primários, que subsidiam a Avaliação do Ciclo de Vida e a análise econômica do sistema, contribuindo para a discussão sobre o papel de reatores anaeróbios na valorização e manejo da biomassa no contexto do saneamento e da economia circular.

5.2. Metodologia

5.2.1. Desenho experimental

O sistema avaliado neste estudo corresponde a um reator anaeróbio de leito estruturado de fluxo ascendente, com volume útil de 2,4 L, alimentado com biomassa composta por um consórcio microalgal-bacteriano cultivado em AR domésticas. A estrutura do reator é composta de um cilindro de acrílico e leitos reacionais preenchidos por hastes metálicas e cilindros de polietileno de baixa densidade (PEBD). O sistema foi operado ao longo de 69 dias, sob COV de $5 \text{ kgDQO.m}^{-3}.\text{d}^{-1}$ e temperatura constante de 25°C , em regime contínuo, visando representar condições próximas às observadas em sistemas de tratamento em operação.

O tempo de retenção hidráulica (TRH) foi ajustado em função da concentração de matéria orgânica, expressa como demanda química de oxigênio (DQO) da biomassa de entrada, variando entre 4 e 24 horas ao longo do período operacional. Adicionalmente, o desempenho do reator passou por três diferentes fases operacionais, definidas a partir da aplicação de distintos valores de pH no afluente, com o objetivo de favorecer a etapa acidogênica do processo anaeróbio. Na Fase I, o sistema foi operado sem ajuste de pH; na Fase II, o pH do afluente foi ajustado para 5; e, na Fase III, o reator foi submetido à acidificação do afluente para pH 3.

Dessa forma, a presente avaliação considera o desempenho efetivo do reator anaeróbio contínuo no tratamento e na valorização da BMB, cuja operação foi

inicialmente direcionada ao favorecimento da etapa acidogênica do processo anaeróbio. No entanto, como não foi observada a produção fermentativa de hidrogênio ao longo da operação contínua, a análise adotou a produção de biogás como um coproduto do sistema, conforme efetivamente verificado experimentalmente. Os dados experimentais referentes às vazões volumétricas, à composição das correntes de entrada e saída, ao consumo energético dos equipamentos e à produção efetiva de biogás foram utilizados para a elaboração dos balanços de massa e energia do sistema. Esses balanços subsidiaram as análises ambiental e econômica conduzidas neste estudo, assegurando a representatividade do desempenho efetivo do processo avaliado.

5.2.2. Simulação do processo de digestão anaeróbia

A simulação do processo anaeróbio de tratamento e valorização da BMB foi realizada utilizando o simulador de processos Aspen Plus versão 14.1., considerando um único cenário integrado, representado na Figura 12. O sistema compreendeu a alimentação contínua do reator anaeróbio, com ajuste de pH do afluente por meio da adição de HCl 37%, seguida pelo bombeamento da biomassa para a etapa de digestão anaeróbia. Como produtos do processo, foram consideradas a geração de biogás, composto principalmente por CH_4 e CO_2 , a liberação de N_2 associada às rotas de remoção de nitrogênio, e a produção de um efluente líquido. O efluente foi posteriormente submetido a uma etapa de filtração, resultando na separação das fases sólida e aquosa.

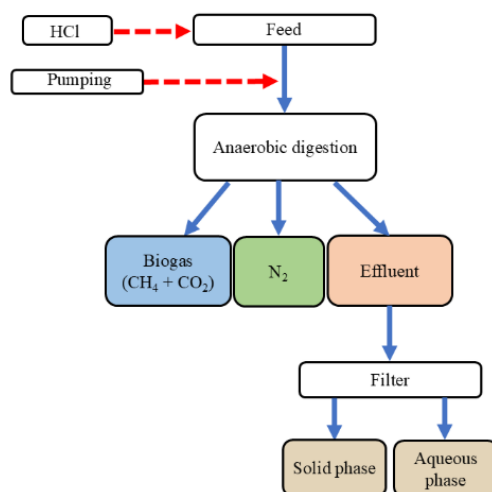


Figura 5.1. Diagrama simplificado do processo de valorização e tratamento da BMB através da digestão anaeróbia.

O estudo considerou um cenário de scale-up para uma capacidade de processamento correspondente a uma vazão de efluente de $11 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Essa vazão foi definida com base na geração média de esgoto doméstico, nível mundial, associada a uma população equivalente de aproximadamente 2.238 habitantes, considerando valores per capita reportados na literatura internacional (Qadir et al., 2025).

O processo proposto foi dividido em duas etapas, digestão anaeróbia seguida da separação do biogás. Adicionalmente, as seguintes considerações foram feitas: (i) o processo ocorreu em condições de estado estacionário; (ii) os modelos Non-Random Two-Liquid (NRTL) foram escolhidos como as equações de estado que melhor se ajustam ao cálculo das propriedades termodinâmicas do processo de digestão anaeróbia; as etapas reacionais descritas no processo proposto tiveram como base os dados os trabalhos desenvolvidos por Rogeri et al. (2023); (iii) o efluente obtido após o cultivo, utilizado como matéria-prima para os processos propostos, foi considerado uma mistura de água (93%) e biomassa seca (7%) (Assis et al., 2020; Silva et al., 2024); (iv) a etapa de cultivo de biomassa não foi simulada, pois considera-se a pré-existência de unidades de produção de biomassa, necessárias ao tratamento do efluente e o custo relacionado ao cultivo foi estimado a partir do valor apresentado por Ranganathan e Savithri (2019); (vii) o reator de rendimento (RYield) foi usado para a etapa de fermentação, com base nos dados experimentais obtido neste trabalho.

5.2.3. *Análise Econômica*

Para realizar a análise de viabilidade econômica foi considerada uma planta operando 24 h dia^{-1} , 330 dias por ano, sendo os 35 dias restantes usados para manutenção dos equipamentos, dividido em turnos de 8h, com o salário médio por empregado de USD 24.000 ano^{-1} (Chen e Quinn, 2021; Jones et al., 2014). Foi considerado um tempo de implantação de 3 anos, devido à instalação dos equipamentos e construção do local, e vida útil do projeto de 20 anos.

Para a determinação do preço mínimo de venda (PMV) do biogás, foi utilizada a planilha de avaliação econômico-financeira proposta por Peters et al. (2003), com base nos custos de aquisição dos equipamentos estimados pelo pacote Aspen Process Economic Analyzer. O PMV foi determinado considerando um valor presente líquido (VPL) igual a zero para o horizonte de análise adotado. Os principais parâmetros econômicos, custos e indicadores utilizados na avaliação são apresentados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1. Resumo dos parâmetros econômicos e custos de matéria-prima e utilidade empregados na análise econômica do tratamento anaeróbio e da valorização da BMB.

Parameter	20 years horizon	References
Internal rate of return	10%	Masoumi and Dalai (2021)
Operating hours per year	7920	Masoumi and Dalai (2021)
Lang factor	4.3 for fixed capital investment (FCI)	Masoumi and Dalai (2021)
Working capital cost	12% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Operating labor	24,000 USD/year per employee	Masoumi and Dalai (2021)
Supervisory and clerical labor	15% of labor cost	Masoumi and Dalai (2021)
Maintenance and repairs	6% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Operating supplies	15% of maintenance and repairs	Masoumi and Dalai (2021)
Local taxes	1% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Insurance	1% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Overhead	60% of (operating labor, supervision, and maintenance)	Masoumi and Dalai (2021)
Capital charge	12% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Depreciation	10% of FCI	Masoumi and Dalai (2021)
Administrative cost	25% of overhead	Masoumi and Dalai (2021)
Distribution and selling costs	5% of total expenses	Peters et al. (2003)
Research and development	4% of total expenses	Peters et al. (2003)
Income tax rate	21%	Peters et al. (2003)
Feedstock		Peters et al. (2003)
Water	USD 0.43 m ³	Nakason et al. (2025)

Parameter	20 years horizon	References
HCl	USD 0.66 L ⁻¹	Dasgupta; Chandel, (2020)
Electricity	USD 0.084 kWh ⁻¹	Liu et al. (2025); Qi et al. (2023)

5.2.4. Avaliação do Ciclo de Vida (ACV)

A ACV foi conduzida em conformidade com as normas internacionais estabelecidas pela International Organization for Standardization (ISO), especificamente ISO 14040 - Avaliação do Ciclo de Vida: Princípios e Estrutura (ISO, 2025) e ISO 14044 - Avaliação do Ciclo de Vida: Requisitos e Diretrizes (ISO, 2006). Assim, o estudo seguiu as quatro etapas previstas nessas normas: (i) definição do objetivo e escopo; (ii) análise do inventário do ciclo de vida; (iii) avaliação do impacto do ciclo de vida; e (iv) interpretação dos resultados.

O objetivo da ACV foi quantificar os impactos ambientais associados ao tratamento e valorização da BMB cultivada em águas residuárias domésticas por meio da digestão anaeróbia em reator contínuo, obtendo o biogás como coproduto. A unidade funcional adotada foi 1 kg de biomassa, utilizada como referência para a normalização dos fluxos de entrada e saída do sistema avaliado.

O inventário do ciclo de vida foi elaborado prioritariamente a partir de simulações de larga escala realizadas a partir dos dados experimentais primários, incluindo vazões, composições das correntes de entrada e saída, consumo energético dos equipamentos e produção de biogás ao longo do período operacional. Considerando a natureza dinâmica do sistema experimental, caracterizado por variações operacionais ao longo do tempo, o inventário foi construído com base em valores médios representativos do período de operação avaliado. Assumiu-se a integração do cultivo de microalgas ao tratamento de águas residuárias, de modo que não foram contabilizadas entradas adicionais de água, nitrogênio (N) e fósforo (P).

O consumo energético associado às unidades de processo foi obtido a partir dos dados experimentais e complementado por estimativas provenientes da simulação do processo, conforme descrito na seção metodológica correspondente. Os processos em segundo plano, incluindo a produção de eletricidade, insumos químicos e outros materiais

auxiliares, foram obtidos a partir da base de dados Ecoinvent, versão 3.8, garantindo consistência metodológica com estudos de ACV amplamente reportados na literatura.

A avaliação dos impactos ambientais foi realizada utilizando o software SimaPro (PRé Sustainability BV, Países Baixos, versão 10.3), aplicando o método ReCiPe 2016 (v. 1.11) sob a perspectiva hierárquica. As categorias de impacto consideradas incluíram: Potencial de aquecimento global (PAG), Depleção da camada de ozônio estratosférico (DCO), Radiação ionizante (RI), Formação de ozônio – saúde humana (FO-SH), Formação de material particulado fino (FMP), Formação de ozônio – ecossistemas terrestres (FO-ET), Acidificação terrestre (AT), Eutrofização em água doce (EAD), Eutrofização marinha (EM), Ecotoxicidade terrestre (ECT), Ecotoxicidade em água doce (ECAD), Ecotoxicidade marinha (ECM), Toxicidade humana carcinogênica (THC), Toxicidade humana não carcinogênica (THNC), Uso do solo (US), Escassez de recursos minerais (ERM), Escassez de recursos fósseis (ERF) e Consumo de água (CA).

Os resultados foram apresentados de forma normalizada, acompanhados de análises de contribuição por etapas e processos. A normalização permitiu a identificação dos impactos com maior ou menor relevância relativa, enquanto as análises de contribuição possibilitaram a identificação de pontos críticos ambientais e gargalos do sistema. A partir dessas análises, foram discutidas oportunidades de melhoria do desempenho ambiental da rota avaliada.

5.3. Resultados e discussão

5.3.1. Diagrama de Fluxo de Processo

O processo de cultivo de BMB foi conduzido em lagoas de alta taxa (LATs). Posteriormente, a biomassa foi misturada com uma solução de HCl (6 mol.L⁻¹) (MIXER2), obtida pela diluição prévia da solução HCl 37% no MIXER1, com o objetivo de acidificar o meio e, consequentemente, favorecer a produção de H₂ por fermentação escura no reator. Em seguida, a mistura foi bombeada (PUMP) e direcionada ao tanque de fermentação, representado como um reator de rendimento (RYIELD), o qual converteu parte da biomassa em biogás através da digestão anaeróbia. A fração gasosa contendo o biogás (GAS) foi separada da mistura sólida/aquosa em um tanque flash (FLASH). Em sequência, a corrente remanescente foi encaminhada ao sistema de filtração (FILTER),

no qual foram separadas a fração aquosa (AQUO) da fração sólida residual (SOL-RESI). Todo o processo pode ser visualizado no diagrama de fluxo do processo exposto na Figura 5.2.

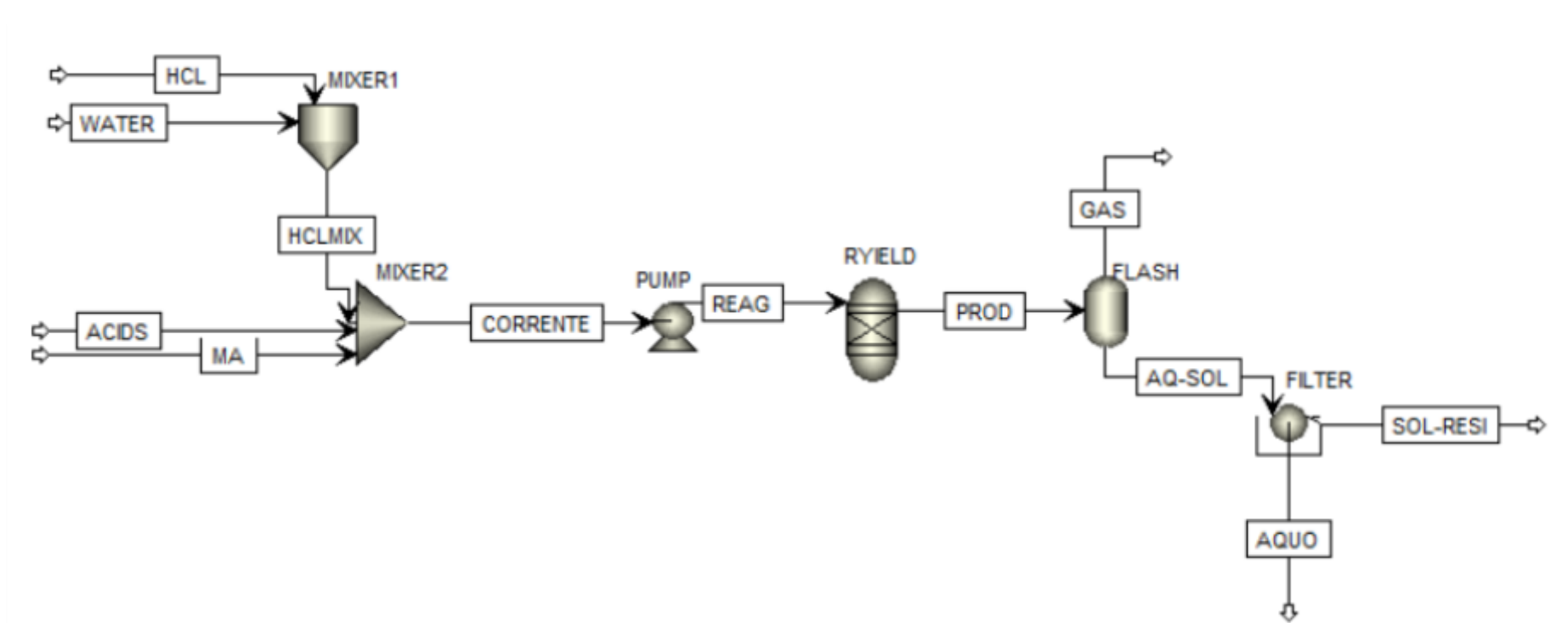


Figura 5.2. Diagrama de fluxo de processos da digestão anaeróbia de BMB.

O balanço de massa do sistema (Figura 5.3) indica que o processo foi alimentado com uma corrente principal composta por BMB, totalizando aproximadamente 11.000 kg h⁻¹ (11 m³), sendo majoritariamente constituída por água (10.628,2 kg h⁻¹) e biomassa seca (446,6 kg h⁻¹). Para o ajuste do pH do afluente, foram adicionados 4,8 kg h⁻¹ de solução de HCl a 32%, juntamente com uma corrente aquosa de 7,4 kg h⁻¹. Como resultado da digestão anaeróbia, a corrente gasosa apresentou produção predominantemente de N₂ (0,243 kg h⁻¹ - 68,06%), seguida por CH₄ (0,096 kg h⁻¹ - 27%) e CO₂ (0,018 kg h⁻¹ - 4,94%), evidenciando a baixa conversão da matéria orgânica em biogás. A fração AQUO do efluente apresentou vazão total de 10.650,6 kg h⁻¹, composta majoritariamente por água e HCl remanescente (4,8 kg h⁻¹). A fração SOL-RESI concentrou principalmente BMB não convertida (444,9 kg h⁻¹), refletindo o desempenho efetivo do sistema sob as condições operacionais avaliadas.

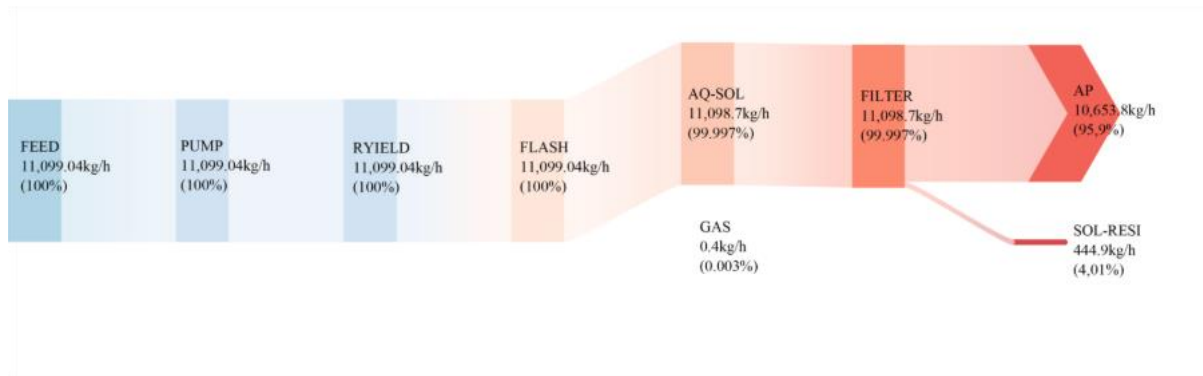


Figura 5.3. Fluxo de massa do processo de digestão anaeróbia da biomassa.

Como resultado, obteve-se uma produção de 0,358 kg h⁻¹ de biogás a partir da conversão de 446,6 kg h⁻¹ de microalga, apresentando um poder calorífico teórico de 13,52 MJ kg⁻¹, estimado com base em um balanço energético teórico do sistema. A partir desse valor, o sistema avaliado apresenta um potencial de geração de aproximadamente 1,34 kWh de energia. A Figura 5.4 apresenta o perfil de consumo de energia do sistema avaliado, com destaque para a etapa de filtração e para o bombeamento das correntes.

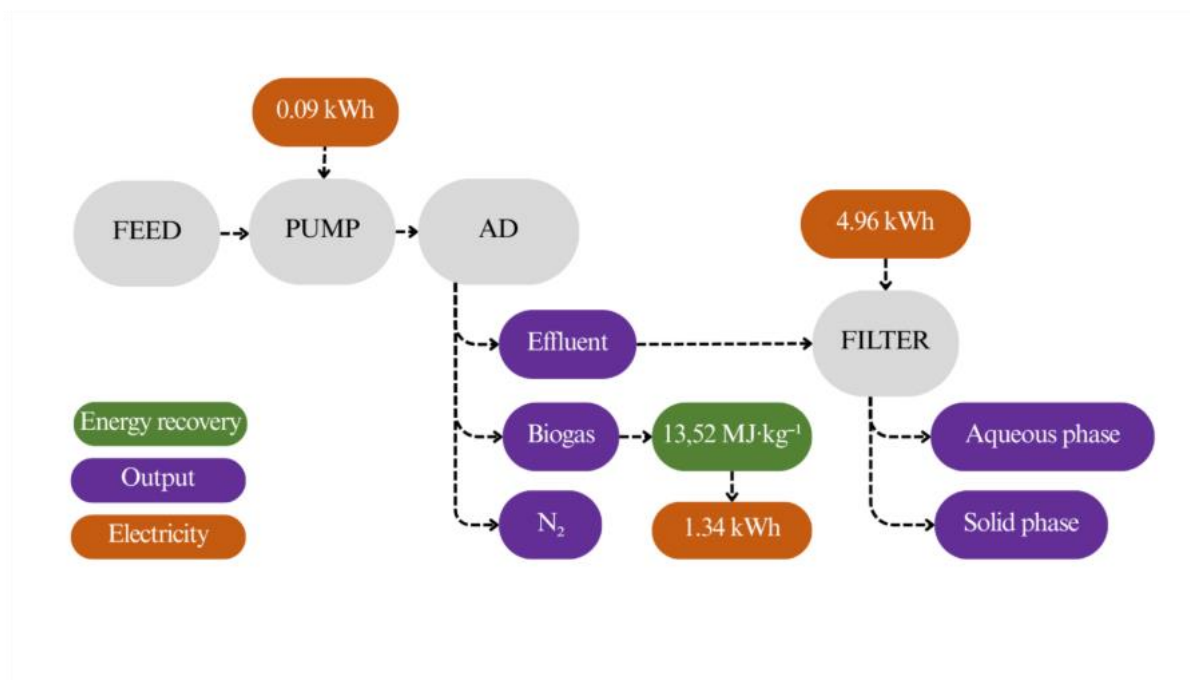


Figura 5.4. Potência energética requerida por cada equipamento no sistema avaliado.

A demanda elétrica total é dominada pela etapa de filtração (4,96 kWh), seguida pelo bombeamento das correntes (0,09 kWh), resultando em consumo significativamente superior ao potencial de geração estimado. Assim, considera-se que o sistema apresenta balanço energético líquido negativo nas condições avaliadas e evidencia-se que a viabilidade energética do sistema está fortemente condicionada à eficiência das etapas de separação sólido-líquido, que configuram o ponto mais crítico em termos energéticos.

A análise conjunta dos balanços de massa e energia indica que apenas uma fração reduzida da matéria orgânica alimentada foi efetivamente convertida em biogás, permanecendo a maior parte do material distribuída nas fases líquida e sólida do efluente. Do ponto de vista energético, o potencial de recuperação associado ao biogás produzido mostrou-se limitado quando comparado à demanda operacional do sistema, especialmente nas etapas de separação e bombeamento. Esse comportamento está diretamente relacionado ao rendimento de CH₄ obtido, parâmetro reconhecidamente crítico para o desempenho energético de sistemas baseados em biomassa microalgal (Milledge e Heaven, 2016). Nesse sentido, a eficiência de conversão da fração orgânica constitui um dos principais fatores condicionantes do desempenho do sistema e foi considerada nas análises subsequentes de viabilidade ambiental e econômica.

5.3.2. Análise econômica

Através da análise econômica do processo foi possível avaliar os preços dos equipamentos (CAPEX) e o custo anual da operação (OPEX), sendo assim possível observar a influência desses fatores no preço final do produto (Figura 5.5).

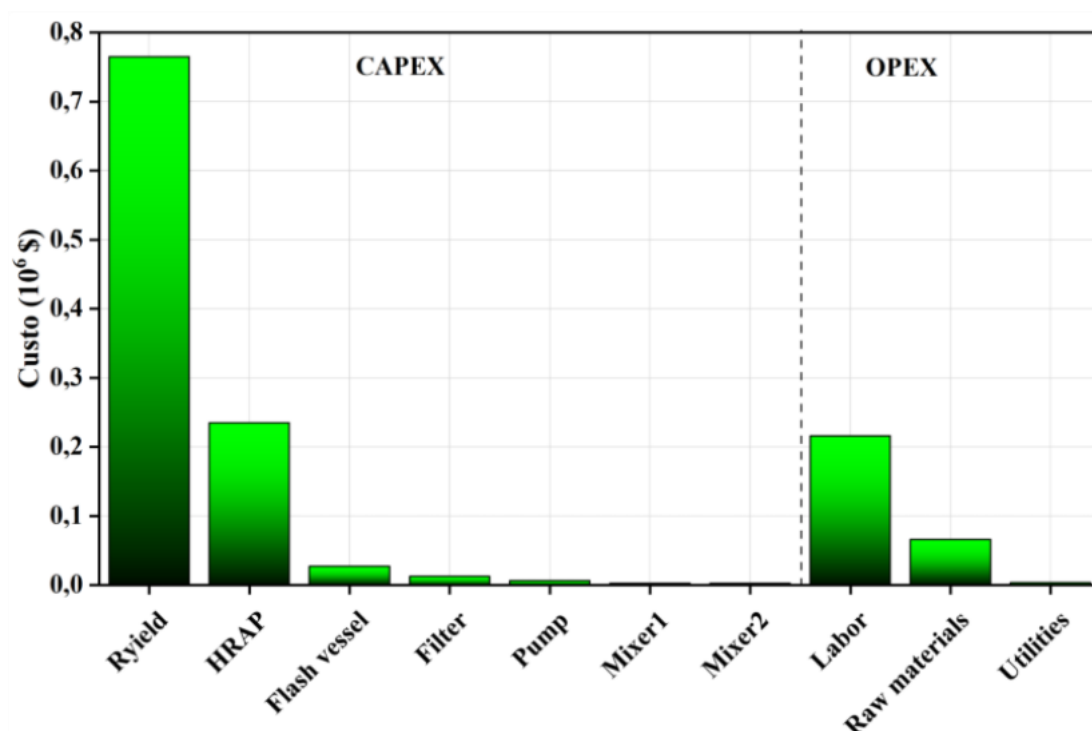


Figura 5.5. CAPEX e OPEX do processo de obtenção do biogás através da digestão anaeróbia de BMB (11 m³.h⁻¹).

Através dos resultados descritos na Figura 16, é possível observar que o maior custo relativo ao CAPEX é atribuído ao reator, seguido do cultivo da microalga, representando 72,81% e 22,35% do investimento total (USD 5,7 milhões), respectivamente. Em relação aos gastos operacionais (OPEX), o salário dos funcionários é o gasto mais relevante, sendo 75,68% do valor total.

Com base nos resultados econômicos, foi estimado um PMV de USD 270,97 kWh⁻¹, valor muito acima do geralmente encontrado na literatura, como no trabalho de Barbera et al. (2022), o qual indicou que o preço da energia gerada por uma planta de biogás está entre 0,233 € kWh⁻¹ a 0,28 € kWh⁻¹. O preço elevado pode ser atribuído à baixa capacidade de processamento ou pela baixa vazão de biogás produzida pelo sistema,

fatores que limitam a viabilidade do processo. Dessa forma, dois cenários adicionais foram avaliados com o objetivo de quantificar o impacto dessas variáveis sobre o preço da energia gerada, considerando capacidades de processamento de $110 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ e $11.000 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$ (Figura 5.6).

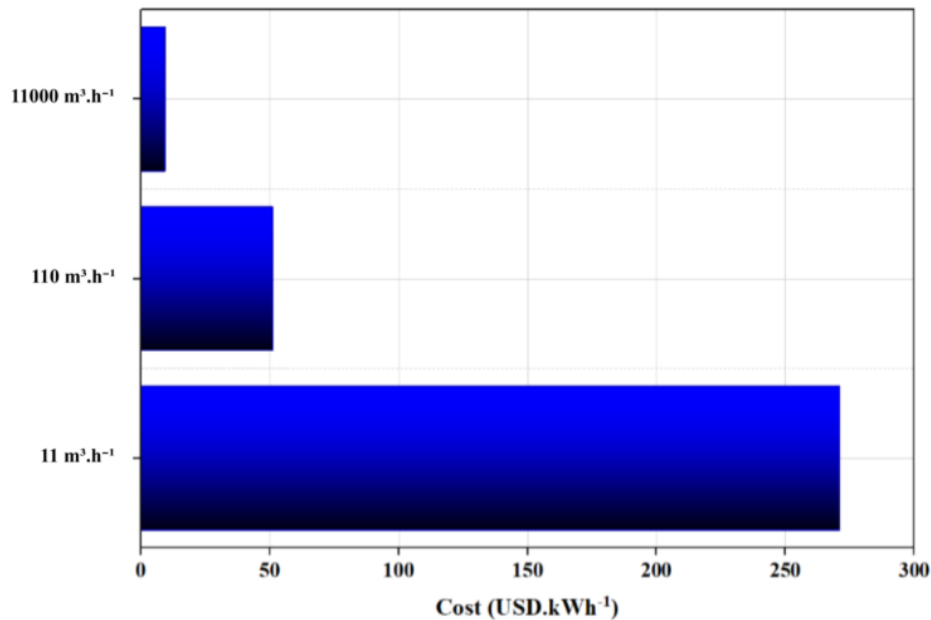


Figura 5.6. Preço do kWh em relação à vazão de entrada do sistema.

Esses resultados indicam que, embora o aumento de escala reduza significativamente o PMV, a viabilidade econômica do processo é fortemente limitada pelo baixo rendimento de conversão da microalga em biogás. Tal limitação sugere que melhorias no desempenho bioquímico do processo, como otimização da digestão anaeróbia, pré-tratamentos mais eficientes ou integração com outras rotas de valorização energética, são fundamentais para tornar o sistema competitivo.

5.3.3. Estratégias para otimização da viabilidade econômica

Os resultados da análise econômica indicaram que a viabilidade do sistema avaliado é sensível ao rendimento de biogás. Estratégias como controle de pH, temperatura, cargas e TRH voltados ao favorecimento de processos metanogênicos, podem proporcionar o aumento da produção de biogás. Nesse sentido, seria possível otimizar o desempenho do processo e favorecer economicamente a rota para tornar-se viável e conceitualmente consistente, uma vez que maiores taxas de recuperação

energética tendem a reduzir significativamente o preço mínimo de venda do produto (Lorenzo et al., 2026).

Além da intensificação da produção de energia, os resultados obtidos neste trabalho permitem a concepção de que a integração do reator anaeróbico contínuo a sistemas de tratamento convencionais poderia ser benéfica tanto ambiental quanto economicamente (Owusu-Agyeman et al., 2023). Após o tratamento do efluente e cultivo da biomassa nas LATs, por exemplo, a BMB gerada passa a concentrar parcela significativa dos nutrientes removidos, especialmente o nitrogênio assimilado durante o cultivo. Nessa configuração, o reator atua sobre a biomassa separada, promovendo sua conversão anaeróbia e a transformação do nitrato em nitrogênio gasoso. Assim, o reator deixa de ser apenas uma unidade de geração energética e passa a integrar a estratégia de manejo do nutriente concentrado na biomassa.

Do ponto de vista ambiental, essa conversão pode reduzir o risco de liberação difusa de nitrogênio durante armazenamento ou disposição da biomassa residual. Sob a perspectiva operacional, a integração da digestão anaeróbia cria a possibilidade de internalizar o gerenciamento do nutriente dentro do próprio sistema de tratamento, conforme discutido por Owusu-Agyeman et al. (2023), evitando etapas externas adicionais e aumentando a eficiência global do processo.

Adicionalmente, a valorização da biomassa residual não convertida na digestão anaeróbia representa uma oportunidade relevante de melhoria econômica. Considerando que a maior fração da BMB permaneceu não degradada, a integração do sistema com rotas complementares de valorização, como produção de biofertilizantes, condicionadores de solo ou insumos para processos termoquímicos, pode ampliar as fontes de receita e reduzir a dependência exclusiva da produção de biogás (Ruales et al., 2025).

De forma geral, os resultados indicam que a viabilidade econômica do sistema está fortemente associada à sua inserção em um contexto integrado de saneamento e economia circular, no qual os ganhos econômicos decorrem não apenas da produção de energia, mas da combinação entre recuperação energética, manejo adequado da biomassa, mitigação de impactos ambientais e redução de custos operacionais em etapas convencionais de tratamento de águas residuárias.

5.3.4. Impactos ambientais

5.3.4.1. Inventário de ciclo de vida

O inventário simplificado do ciclo de vida para os processos avaliados neste capítulo se encontra na Tabela 5.2.

Tabela 5.2. Inventário simplificado de ciclo de vida da digestão anaeróbia.

Estágio		Parâmetros	Unidade
Cultivo	Entrada	Água residuária	23.8 kg
		Elettricidade para as pás	2.05 MJ
	Produtos evitados	Água	23.8 kg
		N fertilizante	100 g
		P fertilizante	16 g
Digestão anaeróbia	Entrada	Elettricidade	18.18 MJ
		Ajuste de pH (ácido clorídrico 32%)	10.78 g
		Água	0.04 kg

Na etapa de cultivo, o sistema utilizou 23,8 kg de água residuária como insumo principal, além de 2,05 MJ de eletricidade destinados à operação das pás. Essa etapa também foi responsável pela geração de produtos evitados, considerando que a utilização de águas residuárias no cultivo tendem a evitar o uso de 23,8 kg de água, 100 g de fertilizante nitrogenado e 16 g de fertilizante fosfatado, refletindo a recuperação de recursos associada a esta etapa.

Na etapa de digestão anaeróbia, o consumo energético foi relativamente baixo, com a demanda de 18,18 MJ de eletricidade. Adicionalmente, o processo requereu 10,78 g de ácido clorídrico (32%) para ajuste de pH, bem como um consumo residual de 0,04

kg de água. Esses insumos estão associados às condições operacionais necessárias para garantir a estabilidade do processo anaeróbio.

5.3.5. Avaliação de impactos ambientais

Os principais resultados normalizados da avaliação de impacto ambiental são apresentados na Figura 5.7, permitindo uma análise comparativa do desempenho ambiental do sistema ao longo das diferentes categorias de impacto avaliadas. De forma geral, o perfil normalizado indica benefícios ambientais líquidos em todas as categorias, evidenciados pelos valores negativos, os quais refletem principalmente a contribuição de produtos evitados e da recuperação de recursos considerada nos limites do sistema.

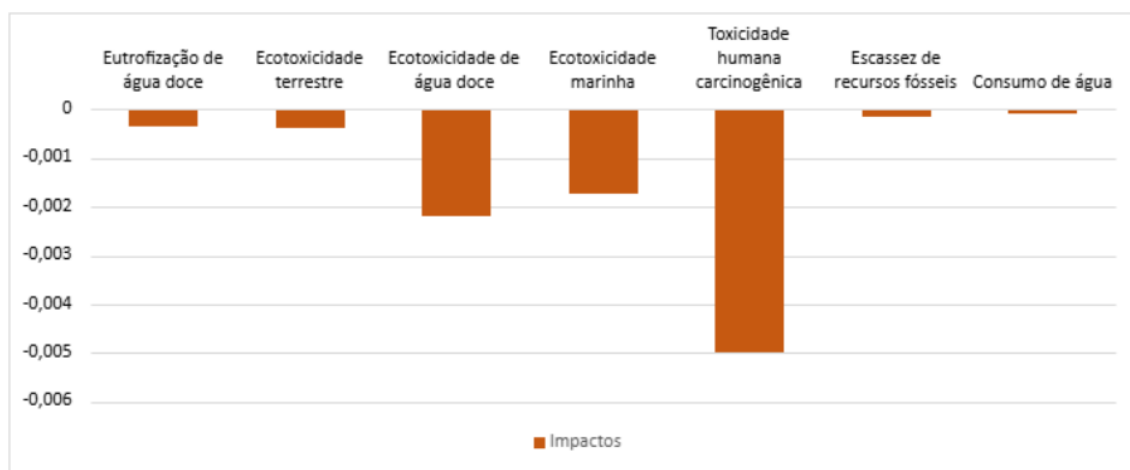


Figura 5.7. Impactos ambientais normalizados.

Os maiores créditos ambientais foram observados na categoria de THC, que apresentou a contribuição negativa mais expressiva entre todas as categorias avaliadas (-48,34%). Esse resultado indica uma redução relevante de impactos associados à exposição humana a substâncias potencialmente carcinogênicas, atribuída principalmente ao uso de água residuária no cultivo da BMB, considerado como produto evitado na análise. De forma semelhante, Santurbano et al. (2024) relataram a categoria de toxicidade carcinogênica humana como a mais beneficiada após a normalização, em função da substituição de água e fertilizantes minerais por produtos evitados no cultivo de microalgas. Segundo os autores, essa substituição resultou em mitigação média de 44,39% dos impactos ambientais, com a água figurando como o principal fator de redução em todas as categorias.

Reduções ambientais também foram observadas nas categorias de ECAD (-21,46%) e ECM (-16,79%). Esses resultados indicam uma diminuição das cargas tóxicas potenciais direcionadas aos ecossistemas aquáticos, uma vez que a ecotoxicidade está associada aos efeitos nocivos de substâncias químicas sobre organismos e comunidades ecológicas (Maciel de Castro et al., 2026). Esse comportamento pode estar relacionado à recuperação de nutrientes durante o processo, ao uso de águas residuárias como meio de cultivo da biomassa e à consequente compensação parcial do uso de fertilizantes minerais convencionais, os quais estão frequentemente associados a maiores potenciais de ecotoxicidade.

As categorias de EAD, ECT, ERF e CA também apresentaram contribuições negativas, somando juntas 9,77% dos impactos evitados. Esses resultados indicam que a recuperação energética, associada ao reaproveitamento de efluentes tratados e à redução da demanda por fontes convencionais de água, contribuem para um desempenho ambiental favorável do processo analisado.

A análise por processo indica que o desempenho ambiental global é fortemente condicionado pela etapa de produção de biomassa, responsável pelos principais créditos ambientais observados em diversas categorias, incluindo PAG, ERF, THC, THNC, ECT, ECM, EAD e CA. Esses créditos superaram os impactos diretos gerados ao longo do sistema, refletindo os benefícios associados ao uso de águas residuárias, à recuperação de nutrientes e à substituição de insumos convencionais. Em contrapartida, o uso do solo (US) apresentou contribuição positiva nessa etapa, em função da demanda por áreas extensas para a implantação e operação das lagoas de alta taxa (LATs).

A etapa de digestão anaeróbia, por sua vez, apresentou contribuições predominantemente positivas, ainda que de menor magnitude, com destaque para a categoria ECT que apresentou as contribuições mais relevantes em termos de potenciais danos ambientais associados a essa etapa. Esses impactos estão associados principalmente ao consumo de energia elétrica e ao uso de reagentes químicos para controle operacional, como o uso de HCl para o ajuste de pH na entrada do processo de digestão anaeróbia. Apesar disso, os valores observados para essa etapa foram bastante inferiores aos créditos obtidos na produção de biomassa, resultando em um balanço ambiental global favorável ao sistema.

5.3.6. *Hotspots do processo*

A análise de hotspots ambientais, baseada no diagrama de Sankey apresentado na Figura 5.8, permite identificar as etapas que mais influenciam o perfil ambiental do sistema em termos de magnitude absoluta. Embora os resultados normalizados indiquem valores predominantemente negativos para a maioria das categorias, o que ocorreu devido aos expressivos créditos ambientais associados à etapa de produção da biomassa, a análise de hotspots permite compreender a relevância estrutural de cada processo ao longo do ciclo de vida.

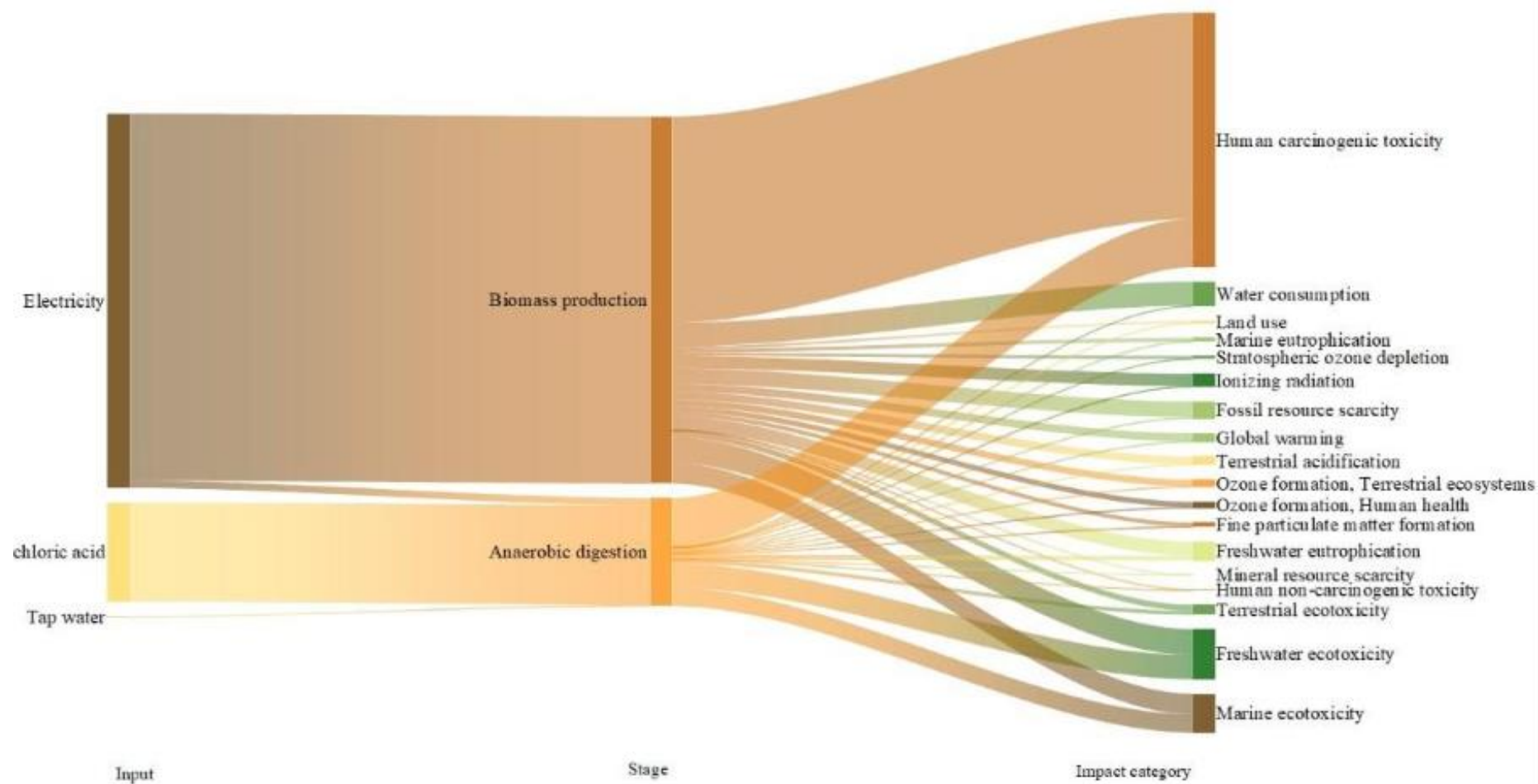


Figura 5.8. Análise de contribuição por processo no sistema analisado.

A produção de BMB destaca-se como o principal hotspot ambiental do sistema, concentrando as maiores contribuições absolutas em diversas categorias de impacto, com destaque para a THC, corroborando com avaliações de ciclo de vida de diversos outros autores que analisaram processos baseados em biomassa microalgal (Souza et al., 2019; Naaz et al., 2023; Xu et al., 2025). Esse comportamento, à primeira vista contraditório, decorre do papel duplo dessa etapa, que simultaneamente gera créditos ambientais significativos, decorrentes da contabilização do uso de água residuária e de fertilizantes como produtos evitados, e cargas ambientais relevantes associadas ao consumo de eletricidade no sistema de cultivo. Dessa forma, mesmo em cenários nos quais o balanço ambiental final é favorável, a produção de biomassa permanece como a etapa mais influente na composição dos impactos.

Em contraste, a etapa de digestão anaeróbia apresentou contribuições de menor magnitude absoluta, porém exclusivamente positivas, não gerando créditos ambientais. Os impactos associados a essa etapa concentram-se principalmente nas categorias de ECAD e ECM, THNC e PAG, sendo atribuídos, sobretudo, ao consumo de insumos químicos para ajuste de pH, à demanda energética auxiliar e à limitada recuperação energética observada no sistema.

Assim, a análise de hotspots evidencia que estratégias de melhoria do desempenho ambiental do sistema devem priorizar a otimização da etapa de produção da biomassa, especialmente por meio da redução do consumo energético, enquanto avanços no desempenho da digestão anaeróbia - em particular no aumento da recuperação energética e na redução do consumo de reagentes - podem contribuir para a mitigação dos impactos residuais do sistema.

5.3.7. Estratégias para ampliação dos benefícios ambientais

Os resultados da análise de ciclo de vida evidenciaram que o desempenho ambiental global do sistema é fortemente influenciado pela etapa de produção da BMB, a qual concentra simultaneamente os principais créditos ambientais e as maiores contribuições absolutas em diversas categorias de impacto. Esse comportamento indica que estratégias de ampliação dos benefícios ambientais devem priorizar intervenções nessa etapa, especialmente aquelas voltadas à redução do consumo energético associado

ao cultivo em LATs, que se destacou como um dos principais hotspots ambientais do sistema.

De modo geral, embora persistam desafios técnicos e estruturais para a consolidação desse tipo de sistema, estudos têm destacado o papel de abordagens sistêmicas e métodos avançados de otimização na melhoria do desempenho de cadeias de bioenergia, com potencial para ampliar a eficiência operacional, reduzir custos e favorecer maior integração energética (Ahmadipour, 2025). Paralelamente, estratégias específicas no nível do processo, como a substituição da matriz elétrica convencional por fontes renováveis no cultivo, também se apresentam como alternativas relevantes para mitigar impactos nas categorias de PAG e THC, no caso do presente estudo, por exemplo (Xu et al., 2025; Castro et al., 2026).

No que se refere à etapa de digestão anaeróbia, os resultados da ACV indicam que o desempenho ambiental do sistema está diretamente associado ao objetivo operacional adotado. Em um cenário orientado à produção de biogás, por exemplo, a eliminação da necessidade de acidificação artificial do meio poderia reduzir significativamente os impactos associados ao uso de reagentes químicos, além de favorecer a atividade das arqueias metanogênicas através do pH neutro e, consequentemente, a recuperação energética do processo.

Por outro lado, sistemas projetados para a interrupção da digestão anaeróbia na fase acidogênica, visando à produção fermentativa de hidrogênio, a partir da acidificação do meio, apresentam maiores impactos ambientais provenientes do uso de produtos químicos utilizados para ajuste de pH na faixa ideal. No entanto, em cenários nos quais a produção de hidrogênio é efetivamente estabelecida, a maior recuperação energética associada a esse produto pode, potencialmente, compensar os impactos adicionais decorrentes do uso de reagentes químicos (Bastola e Hiloidhari, 2026). No sistema avaliado neste estudo, contudo, a produção de hidrogênio não se configurou de forma significativa, de modo que os impactos associados à acidificação não foram contrabalançados por ganhos energéticos equivalentes.

Em ambos os arranjos operacionais, a ampliação dos benefícios ambientais do sistema depende de uma avaliação integrada de múltiplos fatores, incluindo as características do substrato, a disponibilidade de frações prontamente biodegradáveis, as condições operacionais do reator e a eficiência da recuperação energética. De forma geral,

os resultados indicam que a maximização do desempenho ambiental do sistema requer uma abordagem integrada, que considere simultaneamente a otimização do cultivo da biomassa, a intensificação da recuperação energética e a minimização do uso de insumos auxiliares ao longo do processo.

5.4. Conclusão

Este estudo avaliou, de forma integrada, o uso de um reator anaeróbico contínuo do tipo AnSTBR no tratamento e na valorização de BMB oriunda de águas residuárias, considerando a produção de biogás como um coproduto do processo. Embora o direcionamento inicial do sistema tenha sido a produção fermentativa de hidrogênio, a operação contínua evidenciou a predominância de rotas metabólicas associadas à desnitrificação e à metanogênese, com produção de metano em níveis mínimos, refletindo o comportamento efetivo do sistema frente às características intrínsecas da biomassa e às condições operacionais adotadas.

A análise dos dados experimentais, aliada à simulação do processo, indicou baixa conversão da matéria orgânica da BMB em biogás, com predominância de N_2 na corrente gasosa, constituindo limitada recuperação energética. Esses resultados impactaram, principalmente, a valoração do produto final, uma vez que a baixa conversão da BMB em gás foi a principal causa do alto preço do PMV.

Ainda sob a perspectiva econômica, o cenário avaliado demonstra que, o aumento de escala poderia reduzir significativamente o preço mínimo de venda do biogás, desde que também haja aumento da conversão da biomassa em biogás. Sendo assim, a viabilidade econômica do sistema se mostrou fortemente limitada pelo baixo rendimento energético e mesmo após simulação com ganhos de escala o processo ainda não se consolidou como competitivo nas condições analisadas. Adicionalmente, os resultados sugerem que estratégias para otimização do rendimento energético do sistema devem ser exploradas, em estudos futuros, como uma alternativa conceitual para a viabilizar o sistema, principalmente associada a melhorias no desempenho bioquímico da digestão anaeróbia, aspecto que não foi alcançado nas condições operacionais avaliadas.

A Avaliação do Ciclo de Vida revelou um desempenho ambiental globalmente favorável, com benefícios líquidos em todas as categorias de impacto avaliadas,

fortemente influenciados pelos créditos ambientais associados à produção da biomassa, em especial pelo uso de águas residuárias e pela recuperação de recursos. De forma geral, os resultados indicam que o papel do reator anaeróbio contínuo no contexto avaliado está mais associado ao manejo adequado da biomassa e à prestação de serviços ambientais do que à geração de energia, reforçando seu potencial como componente integrado de estratégias de saneamento e economia circular.

Referências

Ahmadipour, M., Ridha, H. M., Ali, Z., Zhining, Z., Ahmadipour, M., Othman, M. M., & Ramachandaramurthy, V. K. (2025). A comprehensive review on biomass energy system optimization approaches: Challenges and issues. In *International Journal of Hydrogen Energy* (Vol. 106, pp. 1167–1183). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2025.02.027>

Assis, L. R., Calijuri, M. L., Assemany, P. P., Silva, T. A. Teixeira, J. S. (2020) Innovative hybrid system for wastewater treatment: High-rate algal ponds for effluent treatment and biofilm reactor for biomass production and harvesting. *Journal of Environmental Management* (Vol. 274). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2020.111183>

Baidoo, E. B., Tulashie, S. K., Alale, E. M., Munumkum, C. A., Acquah, D., Agudah, P. Q., & Asante, P. A. (2025). Revolutionizing bioenergy production: a review on sustainable biomass feedstock. In *Biomass and Bioenergy* (Vol. 201). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108113>

Barbera, E., Bertucco, A., & Kumar, S. (2018). Nutrients recovery and recycling in algae processing for biofuels production. In *Renewable and Sustainable Energy Reviews* (Vol. 90, pp. 28–42). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.004>

Barbera, Elena et al. Techno-economic analysis of a micro-scale biogas plant integrated with microalgae cultivation for the treatment of organic municipal waste. *Chemical Engineering Journal*, v. 450, p. 138323, dez. 2022.

Bastola, J. K., & Hiloidhari, M. (2026). Attributional and consequential life cycle assessment of hydrogen energy production from biomass. *Biomass and Bioenergy*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108889>

Budianto, Kusmardini, D., Murty, K., Nurfadhilah, Iswandi, G. T. P. (2025) Constructing metabolic pathways for biogas production at low temperatures through metagenomic and metatranscriptomic analyses. *Notulae Scientia Biologicae*. (Vol. 17 No. 3). <https://doi.org/10.55779/nsb17312374>

Chen, Peter H.; QUINN, Jason C. Microalgae to biofuels through hydrothermal liquefaction: Open-source techno-economic analysis and life cycle assessment. *Applied Energy*, v. 289, p. 116613, 1 maio 2021.

Chrispim, M. C., Scholz, M., & Nolasco, M. A. (2021). Biogas recovery for sustainable cities: A critical review of enhancement techniques and key local conditions for implementation. In *Sustainable Cities and Society* (Vol. 72). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.scs.2021.103033>

Dasgupta, Arpita; CHANDEL, Munish K. Enhancement of biogas production from organic fraction of municipal solid waste using acid pretreatment. *SN Applied Sciences*, v. 2, n. 8, p. 1437, 28 ago. 2020.

Elgarahy, A. M., Eloffy, M. G., Alengebawy, A., Aboelela, D., Hammad, A., & Elwakeel, K. Z. (2025). Biowaste valorization: Integrating circular economy principles with artificial intelligence-driven optimization for sustainable energy solutions. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 13(3). <https://doi.org/10.1016/j.jece.2025.116673>

Fuess, L. T., Kiyuna, L. S. M., Ferraz, A. D. N., Persinoti, G. F., Squina, F. M., Garcia, M. L., & Zaiat, M. (2017). Thermophilic two-phase anaerobic digestion using an innovative fixed-bed reactor for enhanced organic matter removal and bioenergy recovery from sugarcane vinasse. *Applied Energy*, 189, 480–491. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2016.12.071>

Hajizadeh, Abdollah et al. Hydrogen production from biomass through integration of anaerobic digestion and biogas dry reforming. *Applied Energy*, v. 309, p. 118442, mar. 2022.

ISO. ISO 14040 - Environmental Management-Life Cycle Assessment–Principles and Framework. [s.l: s.n.].

ISO. ISO 14044 – Environmental Management-Life Cycle Assessment–Requires and Guidelines. [s.l: s.n.].

Jones, Susanne B. et al. Process Design and Economics for the Conversion of Algal Biomass to Hydrocarbons: Whole Algae Hydrothermal Liquefaction and Upgrading. Richland, WA (United States): [S.n.].

Liu, Hongyu et al. Calcium looping-enhanced biomass gasification for methanol production: Integrating methane dry reforming and carbon utilization. Separation and Purification Technology, v. 354, p. 129377, fev. 2025.

Lorenzo, D., Abbaspour, A., Ouahabi, Y. R., & Mba Wright, M. (2026). Kinetic-based techno-economic and life cycle assessment of slaughterhouse waste co-digestion for renewable natural gas production. Chemical Engineering Journal, 530. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2026.173365>

Maciel de Castro, A. P. M., Quintão Braga, M., Viana Araujo, P., Carvalho Nogueira da Gama, R., Saleme Aona de Paula Pereira, A., Abrantes Silva, T., Silva Henriques, B., Ferreira Lorentz, J., Vilela Avelar, N., & Calijuri, M. L. (2026). Emerging trends in wastewater-grown microalgae: A techno-economic and environmental perspective. Biomass and Bioenergy, 208. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108838>

Martín, M. A., Gutiérrez, M. C., Dios, M., Siles, J. A., & Chica, A. F. (2018). Application of ATAD technology for digesting sewage sludge in small towns: Operation and costs. Journal of Environmental Management, 215, 185–194.

Masoumi, Shima; Dalai, Ajay K. Techno-economic and life cycle analysis of biofuel production via hydrothermal liquefaction of microalgae in a methanol-water system and catalytic hydrotreatment using hydrochar as a catalyst support. Biomass and Bioenergy, v. 151, p. 106168, 1 ago. 2021.

Max S. Peters; Klaus O. Timmerhaus; Ronald E. West. Plant Design and Economics for Chemical Engineers. New York: [S.n.]. Disponível em: <<https://caf-corporation.com/caf-capex/wp-content/uploads/2021/07/Plant-Design-and-Economics-for-Chemical-Engineers-PDFDrive.com-.pdf>>. Acesso em: 12 out. 2025.

Milledge, J. J., & Heaven, S. (n.d.). Energy balance of biogas production from microalgae: Development of an energy and mass balance model.

- Muradin, M., Joachimiak-Lechman, K., & Foltynowicz, Z. (2018). Evaluation of eco-efficiency of two alternative agricultural biogas plants. *Applied Sciences (Switzerland)*, 8(11). <https://doi.org/10.3390/app8112083>
- Naaz, F., Samuchiwal, S., Dalvi, V., Bhattacharya, A., Kishore Pant, K., & Malik, A. (2023). Hydrothermal liquefaction could be a sustainable approach for valorization of wastewater grown algal biomass into cleaner fuel. *Energy Conversion and Management*, 283. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2023.116887>
- Nakason, Kamonwat et al. Economic viability and life cycle assessment of levulinic acid and hydrochar production via catalytic hydrothermal process of waste lignocellulosic biomass: A comparison of feedstock types. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*, v. 11, p. 101217, jun. 2025.
- Owusu-Agyeman, I., Bedaso, B., Laumeyer, C., Pan, C., Malovanyy, A., Baresel, C., Plaza, E., & Cetecioglu, Z. (2023). Volatile fatty acids production from municipal waste streams and use as a carbon source for denitrification: The journey towards full-scale application and revealing key microbial players. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 175. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2023.113163>
- Peters, Max S.; Timmerhaus, Klaus D. *Solutions Manual to Accompany Plant Design and Economics for Chemical Engineers*. McGraw-Hill, 1991.
- Qadir, M., Drechsel, P. & Jones, E.R. Domestic wastewater treatment and agricultural reuse progress and reporting challenges. *Discov Water* 5, 74 (2025). <https://doi.org/10.1007/s43832-025-00244-8>
- QI, Jianzi et al. Hydrogen production from municipal solid waste via chemical looping gasification using CuFe_2O_4 spinel as oxygen carrier: An Aspen Plus modeling. *Energy Conversion and Management*, v. 294, p. 117562, out. 2023.
- Ranganathan, Panneerselvam; SAVITHRI, Sivaraman. Techno-economic analysis of microalgae-based liquid fuels production from wastewater via hydrothermal liquefaction and hydroprocessing. *Bioresource Technology*, v. 284, p. 256–265, 1 jul. 2019.
- Rogeri, R. C., Fuess, L. T., Eng, F., Borges, A. V. Araújo, M. N., Rissato, M. H., Damianovic, Z., Silva, A. J. (2023) Strategies to control pH in the dark fermentation of sugarcane vinasse: Impacts on sulfate reduction, biohydrogen production and metabolite

distribution. *Journal of Environmental Management* (Vol. 325, part B). <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2022.116495>

Ruales, E., Bellver, M., Álvarez-González, A., Carvalho Fontes Sampaio, I., Garfi, M., & Ferrer, I. (2025). Carotenoids and biogas recovery from microalgae treating wastewater. *Bioresource Technology*, 428. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2025.132427>

Ruales, E., Gómez-Serrano, C., Morillas-España, A., Garfi, M., González-López, C. V., & Ferrer, I. (2025). Microalgae-based biorefinery for biostimulant and biogas production: An integrated approach for resource recovery. *Algal Research*, 91. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2025.104323>

Ruiz, D., San Miguel, G., Corona, B., Gaitero, A., & Domínguez, A. (2018). Environmental and economic analysis of power generation in a thermophilic biogas plant. *Science of the Total Environment*, 633, 1418–1428. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.03.169>

Santurbano, V., Marangon, B., Castro, J., Calijuri, M. L., Leme, M., & Assemany, P. (2024). Enhancing environmental performance in biogas production from wastewater-grown microalgae: A life cycle assessment perspective. *Journal of Environmental Management*, 362. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.121251>

Silva, Thiago Abrantes et al. Biofuel from wastewater-grown microalgae: A biorefinery approach using hydrothermal liquefaction and catalyst upgrading. *Journal of Environmental Management*, v. 368, p. 122091, set. 2024.

Souza, M. H. B., Calijuri, M. L., Assemany, P. P., Castro, J. de S., & de Oliveira, A. C. M. (2019). Soil application of microalgae for nitrogen recovery: A life-cycle approach. *Journal of Cleaner Production*, 211, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.097>

Strazza, C., del Borghi, A., Magrassi, F., & Gallo, M. (2016). Using environmental product declaration as source of data for life cycle assessment: A case study. *Journal of Cleaner Production*, 112, 333–342. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2015.07.058>

Tsapekos, P., Kougias, P. G., Alvarado-Morales, M., Kovalovszki, A., Corbière, M., & Angelidaki, I. (2018). Energy recovery from wastewater microalgae through anaerobic digestion process: Methane potential, continuous reactor operation and modelling

aspects. *Biochemical Engineering Journal*, 139, 1–7.
<https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.08.004>

Xu, Y., Wei, C., Li, B., Li, W., Han, J., Nie, Y., Li, Z., & Xu, L. (2025). Life-cycle and economic assessments of DHA-biogas hierarchical production system utilizing microalgae biomass and residues. *Chemical Engineering Journal*, 503.
<https://doi.org/10.1016/j.cej.2024.158450>

Zamanian, H., Askaripour, H., & Rashtchian, D. (2026). Simulation of anaerobic digestion process and economic valuation: Study on single and Co-digestion strategies of various feedstocks. *Biomass and Bioenergy*, 207.
<https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108738>

6. CONCLUSÃO GERAL

Esta dissertação analisou a digestão anaeróbia de biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias, avaliando seu desempenho em sistemas contínuos sob diferentes condições operacionais e discutindo suas implicações técnicas, ambientais e econômicas no contexto do saneamento ambiental e da recuperação de recursos.

Do ponto de vista técnico-operacional, os resultados evidenciaram que a produção fermentativa de hidrogênio não foi estabelecida nas condições avaliadas. Ainda assim, observou-se consumo de matéria orgânica, elevada remoção de nitrato, formação limitada de metabólitos solúveis e produção residual de metano. O comportamento metabólico do sistema mostrou-se fortemente condicionado às características intrínsecas da biomassa microalgal-bacteriana, especialmente à baixa disponibilidade de frações prontamente fermentáveis e ao elevado teor de compostos nitrogenados, que favoreceram rotas metabólicas competitivas, como a desnitrificação. Alterações na carga orgânica volumétrica e no pH influenciaram o desempenho global do sistema, porém não foram suficientes, de forma isolada, para promover o estabelecimento de condições acidogênicas típicas.

Sob a perspectiva ambiental, a Avaliação do Ciclo de Vida indicou desempenho globalmente favorável, com balanços positivos nas categorias de impacto avaliadas. Esses resultados estiveram associados principalmente aos créditos ambientais decorrentes do uso de águas residuárias no cultivo da biomassa e da recuperação de recursos, evidenciando que os benefícios ambientais do sistema são pouco sensíveis ao baixo rendimento energético observado. Nesse contexto, o papel do reator anaeróbio contínuo mostrou-se mais relevante como etapa de remoção de nitrogênio e de prestação de serviços ambientais do que como unidade dedicada à geração de energia.

Do ponto de vista econômico, os resultados indicaram que o baixo rendimento de conversão da matéria orgânica da BMB em biogás constitui o principal fator limitante para a viabilidade do processo. A análise de escala demonstrou que o aumento da capacidade operacional contribui para a diluição de custos fixos e para a redução do preço mínimo de venda do biogás. No entanto, quando a produção energética permanece limitada, os benefícios associados à economia de escala tornam-se insuficientes para

compensar a baixa geração de biogás. Assim, os resultados indicam que o aumento de escala, de forma isolada, não é capaz de tornar o sistema economicamente competitivo nas condições avaliadas.

De forma integrada, os resultados desta dissertação demonstram que, nas condições operacionais investigadas, a digestão anaeróbia da biomassa microalgal-bacteriana cultivada em águas residuárias não se consolidou como uma rota eficiente de valorização energética, em função da limitada conversão da matéria orgânica em biogás e da predominância de rotas metabólicas competitivas, como a desnitrificação. Em contrapartida, o sistema apresentou desempenho consistente quanto à remoção de nitrogênio, indicando que seu principal potencial reside na prestação de serviços ambientais quando inserido em cadeias de tratamento de efluentes. Nesse contexto, a recuperação energética deve ser compreendida como um coproduto condicionado à superação de limitações intrínsecas da biomassa, especialmente a baixa disponibilidade de frações prontamente fermentáveis e o elevado teor de nitrogênio, o que requer estratégias adicionais de manejo do substrato e do processo.

Ainda, com base nos resultados obtidos, estudos futuros devem investigar estratégias voltadas à superação das limitações intrínsecas da biomassa microalgal-bacteriana, particularmente a baixa disponibilidade de frações prontamente fermentáveis e a elevada presença de compostos nitrogenados. Abordagens como o direcionamento do cultivo microalgal para maior acúmulo de carboidratos, o ajuste da relação C/N, a separação de estágios anaeróbios e a aplicação de pré-tratamentos físicos, químicos ou biológicos podem reduzir a competição metabólica observada e ampliar o potencial de recuperação energética. Além disso, a avaliação dessas estratégias sob operação contínua e integrada a sistemas de tratamento de efluentes em operação é essencial para avançar na consolidação da digestão anaeróbia como componente de cadeias de saneamento e economia circular.

REFERÊNCIAS

- Assemany, P., de Paula Marques, I., Calijuri, M.L. et al. Complementarity of Substrates in Anaerobic Digestion of Wastewater Grown Algal Biomass. *Waste Biomass Valor* 11, 5759–5770 (2020). <https://doi.org/10.1007/s12649-019-00875-8>
- Bohutskyi, P., Betenbaugh, M. J., & Bouwer, E. J. (2014). *The effects of alternative pretreatment strategies on anaerobic digestion and methane production from different algal strains*. *Bioresource Technology*, 155, 366–372. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.12.095>
- Calijuri, M. L., do Couto, E. de A., Assemany, P. P., Ribeiro, V. J., Lorentz, J. F., Castro, J. de S., Assis, L. R. de, Oliveira, A. P. de S., Pereira, A. S. A. de P., Marangon, B. B., Magalhães, I. B., Silva, T. A., Ferreira, J., Braga, M. Q., Gama, R. C. N. da, & Henriques, B. S. (2025). Microalgae-Based Wastewater Treatment and Biomass Valorization: Insights, Challenges, and Opportunities from 15 Years of Research. In *ACS Omega* (Vol. 10, Issue 42, pp. 49273–49299). American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsomega.5c04364>
- Geng, Y., Shaukat, A., Azhar, W. et al. Microalgal biorefineries: a systematic review of technological trade-offs and innovation pathways. *Biotechnol. Biofuels Bioprod.* 18, 93 (2025). <https://doi.org/10.1186/s13068-025-02694-7>
- Ghimire, A., Frunzo, L., Pirozzi, F., Trably, E., Escudié, R., Lens, P. N. L., & Esposito, G. (2015). A review on dark fermentative biohydrogen production from organic biomass: Process parameters and use of by-products. *Applied Energy*, 144, 73–95. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2015.01.045>
- Govindasamy, G., Balaji, P. J. Configuring municipal solid and liquid waste treatment plants into bio-refinery to achieve sustainable development goals. *J Mater Cycles Waste Manag* 27, 2016-2031 (2025). <https://doi.org/10.1007/s10163-025-02231-6>
- Li, R., Guo, D., Li, T. et al. Effect of C:N ratio on treatment of mixed industrial-domestic wastewater by microalgae-bacteria consortium. *Biomass Conv. Bioref.* 15, 10829–10837 (2025). <https://doi.org/10.1007/s13399-024-05871-0>
- Mahdy, A., Mendez, L., Ballesteros, M., & González-Fernández, C. (2014). *Enhanced methane production of Chlorella vulgaris and Chlamydomonas reinhardtii by hydrolytic*

enzymes addition. *Energy Conversion and Management*, 85, 551–557.
<https://doi.org/10.1016/j.enconman.2014.04.097>

Maciel de Castro, A. P., Quintão Braga, M., Viana Araujo, P., Carvalho Nogueira da Gama, R., Saleme Aona de Paula Pereira, A., Abrantes Silva, T., Silva Henriques, B., Ferreira Lorentz, J., Vilela Avelar, N., & Calijuri, M. L. (2026). Emerging trends in wastewater-grown microalgae: A techno-economic and environmental perspective. *Biomass and Bioenergy*, 208. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2025.108838>

Mohit, A., Mishel, V. K., & Remya, N. (2024). Life cycle assessment and technoeconomic analysis of biofuels produced from polyculture microalgae cultivated in greywater. *Journal of Environmental Management*, 356. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2024.120711>

Passos, F., Uggetti, E., Carrère, H., & Ferrer, I. (2014). *Pretreatment of microalgae to improve biogas production: A review*. *Bioresource Technology*, 172, 403–412. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.08.114>

Prajapati, A. K., Ali, S. S., Kashyap, A., Ansari, K. B., Singh, S., Kumar, A., Rajnandani, Awasthi, V., Singh, S., Shkir, M., Kumar, R., & Shakeelur Raheman, A. R. (2026). Harnessing waste for energy: feedstock, technological advancement, sustainability, life cycle evaluation, and future perspectives. In *Fuel* (Vol. 410). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2025.137965>

Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P.-Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). *Morphology, composition, production, processing and applications of Chlorella vulgaris: A review*. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265–278. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.04.007>

Salazar-Batres, K.J., Moreno-Andrade, I. Review of the Effects of Trace Metal Concentrations on the Anaerobic Digestion of Organic Solid Waste. *Bioenerg. Res.* 18, 24 (2025). <https://doi.org/10.1007/s12155-025-10826-y>

Silva, T. A., de Jesus Junior, M. M., de Araujo, M. N., de Castro, L. S., Fuess, L. T., de Ávila Rodrigues, F., Zaiat, M., dos Reis, A. J. D., & Calijuri, M. L. (2026). Enhancing microalgal biohydrogen production: Unlocking higher yields with hydrothermal

pretreatment with niobium phosphate. Renewable Energy, 259.
<https://doi.org/10.1016/j.renene.2025.125048>