

ESTUDO COMPARATIVO DE SUPORTES PARA REACTORES ANAERÓBIOS DE LEITO FLUIDIZADO

Alves, M.M.(*); Mota, M.(*); Novais, J.M(**)

RESUMO

O desempenho dos reactores anaeróbios de leito fluidizado é fortemente dependente do tipo de suporte que se utiliza para imobilização da biomassa. Neste trabalho é testada uma instalação laboratorial que permite comparar diversos materiais quanto à capacidade de retenção de biomassa, revelando-se um método expedito para obter informação preliminar sobre este aspecto particular dos suportes. Comparam-se cinco materiais diferentes (argila expandida, vidro poroso, vidro rugoso, vidro liso e policarbonato), concluindo-se que a argila e o vidro poroso retêm a maior quantidade de biomassa por unidade de volume e que o vidro rugoso, consegue fixar mais do dobro da quantidade de biomassa que o vidro liso. É estudada a influência dos vários materiais na actividade duma população mista de bactérias metanogénicas tendo-se concluído que nenhum dos materiais influencia fortemente essa actividade.

PALAVRAS CHAVE

Reactor Anaeróbio de Leito Fluidizado; Material de Suporte; Imobilização de Biomassa

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se assistido a um acentuado desenvolvimento de investigação em tecnologia de digestão anaeróbia, particularmente no estudo dos processos de alta carga. Este interesse é naturalmente induzido pelo reconhecimento geral de que estes processos são apropriados para o tratamento de vários tipos de efluentes, domésticos e industriais.

Os vários processos de alta carga existentes diferem entre si, basicamente, quanto à forma de retenção da biomassa que pode ocorrer segundo três formas distintas (Iza *et al.*, 1991):

- adesão a suportes fixos ou móveis
- granulação
- recirculação

Num Reactor Anaeróbio de Leito Fluidizado (RALF), a biomassa encontra-se imobilizada num suporte sólido estando o conjunto fluidizado. É sabido que o desempenho deste tipo de reactor é fortemente dependente do tipo de material que se utiliza como suporte de imobilização (Fox *et al.*, 1990).

Num RALF o diâmetro das partículas, a sua densidade a expansão do leito e a velocidade superficial são variáveis dependentes. Normalmente a expansão do leito deve ser mantida baixa, ($\epsilon = 0.60$) sem contudo permitir o contacto entre as partículas (Andrews, 1986). Se se usarem partículas grandes e pesadas, são necessárias grandes velocidades superficiais o que implica custos de bombagem elevados e elevada tensão de corte que condiciona o desenvolvimento do biofilme em torno das partículas. Diminuindo o diâmetro das partículas aumenta a área superficial, diminui a tensão de corte e os custos de bombagem. No início de operação dum RALF as partículas são inertes e com o crescimento microbiano tornam-se maiores e menos densas, variando a sua velocidade terminal.

(*) Universidade do Minho, Depart^o de Engenharia Biológica, Largo do Paço, 4719 BRAGA codex

(**) Instituto Superior Técnico, Lab. de Eng^a Bioquímica, Av. Rovisco Pais, 1096 LISBOA codex

Daqui se pode concluir que, dado o grande número de variáveis envolvidas, a caracterização rigorosa dos parâmetros de projecto deste tipo de reactores é praticamente impossível (Fdz-Polanco e Diez, 1988). No entanto, compreende-se que a escolha do material de suporte é um dos aspectos chave do projecto destes reactores.

O material mais amplamente utilizado é a areia (Heijnen *et al.*, 1986), provavelmente por razões de disponibilidade e custo, sendo, no entanto, entendida como uma escolha longe do óptimo no que respeita à capacidade de retenção de biomassa. Na verdade, outros materiais têm sido testados, nomeadamente vidro poroso (Jördening, 1992), carvão activado (Fox *et al.*, 1990), sepiolite (Balaguer *et al.*, 1992), com obtenção de melhores resultados.

A tensão de corte é um factor chave no desenvolvimento do biofilme, sendo importante na selecção do tipo de população microbiana que o compõe (Yee, 1990). Por outro lado, sabe-se que a composição do substrato exerce forte influência na formação do biofilme. Excepto para o caso de efluentes complexos dificilmente degradáveis, o passo limitante no processo de digestão anaeróbia é a conversão de acetato a metano (Henze e Harremões, 1983), que produz 70% do metano total (Jeris e McCarty, 1965). Deste modo é compreensível a importância que têm as bactérias metanogénicas consumidoras de acetato na constituição dos biofilmes metanogénicos.

O melhor suporte a utilizar num RALF será aquele que, empiricamente, permite obter melhores eficiências de remoção de substrato para a mesma carga orgânica aplicada, para o mesmo tipo de substrato e nas mesmas condições de operação; assim, a comparação efectiva de diferentes materiais só deve ser efectuada operando reactores de leito fluidizado. No entanto, se se quiserem comparar vários tipos de suportes e atendendo aos tempos elevados que são normalmente necessários para o arranque deste tipo de sistemas conclui-se que, do ponto de vista experimental, se torna pouco prático optar por essa metodologia.

O melhor desempenho dum material relativamente a outro tem a ver, fundamentalmente, com a maior capacidade de retenção de biomassa que está relacionada com as características da superfície, nomeadamente rugosidade, hidrofobicidade, interações electrostáticas e com a porosidade e tamanho de poros do suporte (Yee, 1990; Messing e Oppermann, 1979).

Pensa-se que, em materiais não porosos, a existência de pequenas cavidades com tamanho semelhante ao das células favorece a fixação dos microorganismos, protegendo-os dos efeitos da tensão de corte (Huysman *et al.*, 1983).

Sabe-se que, nem todas as bactérias metanogénicas têm a mesma tendência para aderir a determinadas superfícies; considerando materiais poliméricos com diferentes hidrofobicidades, e usando culturas puras de 4 bactérias metanogénicas, Verrier *et al.* (1988), concluiu que *Methanothrix soehngenii* prefere superfícies hidrofóbicas, *Methanospirillum hungatei* prefere superfícies hidrofílicas, *Methanosarcina mazei* MC3 não tem tendência para aderir a nenhum dos materiais testados e *Methanobrevibacter arboriphilicus* adere indiscriminadamente a todas as superfícies. Outros autores referem que *Methanosarcina barkeri*, em cultura pura, não adere, verificando-se no entanto que integra o biofilme formado por uma cultura mista, provavelmente por incorporação no biofilme já existente (Meier-Schneiders *et al.*, 1993).

Wang e Wang (1988), baseados num modelo matemático simples, concluem que num suporte poroso, a capacidade máxima de fixação de microorganismos ocorre quando a relação entre o tamanho dos poros e das células se situa entre 2 e 5. Convém referir que a imobilização em suportes porosos pode ser problemática devido a efeitos difusionais internos. No entanto alguns autores referem que a utilização de suportes porosos permite

reduzir o tempo necessário ao arranque dum RALF em mais de 50 % (Yee *et al.* 1992) e que este tipo de suporte permite aplicar cargas orgânicas muito mais elevadas do que utilizando areia (Jördening, 1992).

A utilização de alguns suportes não inertes tais como a argila pode ter um efeito estimulatório ou inibitório na actividade metanogénica devido a interações químicas entre o material e o meio de cultura (Murray e Van Den Berg, 1981; Bonastre e Paris, 1988).

Este trabalho pretende estudar comparativamente cinco tipos de suporte para reactores anaeróbios de leito fluidizado, segundo dois aspectos distintos:

- efeito dos materiais na actividade duma população mista de bactérias metanogénicas.
- capacidade de retenção de biomassa.

2 - MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 - Suportes

Os suportes testados foram:

Argila expandida (**A**)
Vidro expandido - "Poraver" (**P**)
Vidro rugoso (**VR**)
Vidro Liso (**VL**)
Policarbonato (**PC**)

O vidro rugoso foi obtido por tratamento do vidro liso com uma solução de EDTA 40 g/l à temperatura de ebulição, pH 10 e durante 48 horas (Pereira Cardoso, J., 1977).

A características mais relevantes dos cinco tipos de materiais testados encontram-se na tabela I.

Tabela I - Características dos suportes testados

Suporte	Diâmetro médio, (mm)	Densidade	Porosidade
A	4.8-6.3	1.7(*)	0.40
P	4.8-6.3	1.2(*)	0.86
VR	6.0	2.6	-
VL	6.0	2.6	-
PC	2.0	1.2	-

(*) densidade da partícula cheia com água

2.2 - Procedimento experimental

Para avaliar o efeito de cada suporte na actividade microbiana foram realizados ensaios em frascos de 500 ml com cada um dos suportes, em duplicado. Adicionou-se a cada frasco, 50 ml de suporte, o inóculo, os nutrientes (excepto o ácido acético), água até perfazer 500 ml, borbulhou-se azoto e fecharam-se os frascos com rolhas de borracha butírica e tampas roscadas em plástico; após um período de aclimação a 35 °C (cerca de 4 horas)

adicionaram-se cerca de 4.6 ml de uma solução concentrada de ácido acético neutralizado a pH 7, por meio de uma agulha, através da rolha. Durante todo o ensaio, manteve-se uma seringa colocada na rolha (Fig. 1), o que permitiu a recolha das amostras e a adição de substrato. Os frascos foram colocados num incubador orbital a 130 rpm e a 35 °C.



Fig. 1 - Esquema da configuração usada nos testes batch

Realizaram-se dois tipos de ensaios de controlo:

- sem suporte - 2 frascos (duplicado);
- sem biomassa - 5 frascos, 1 com cada suporte.

Deste modo foi possível, por um lado eliminar o efeito do suporte no consumo de substrato e ainda averiguar se existiam perdas de acetato por volatilidade ou adsorção nos suportes. Determinou-se também periodicamente o pH e o potencial de oxidação redução em cada frasco, verificando-se a necessidade de fazer correcções de pH.

Realizaram-se duas adições sucessivas de substrato, considerando que a segunda adição representa o comportamento duma população já relativamente adaptada ao substrato utilizado. Quando o substrato atingiu níveis não detectáveis na maioria dos frascos, procedeu-se à determinação do conteúdo em sólidos, em suspensão, e aderidos aos suportes, tal como já descrito.

Para estudar os diversos materiais de suporte quanto à capacidade de retenção de biomassa, construiu-se uma instalação laboratorial em vidro acrílico cujo esquema se apresenta na Fig. 2.

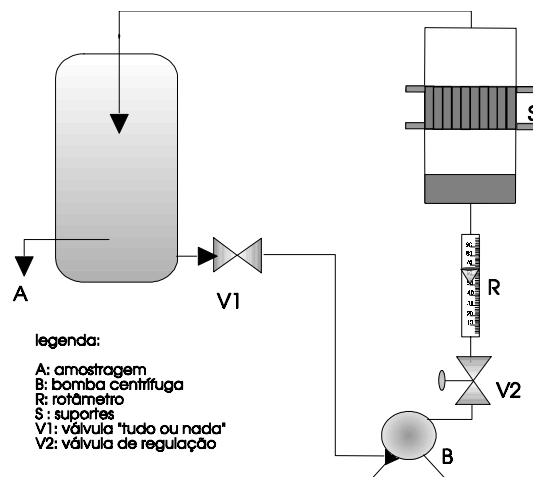


Fig.2 - Esquema da instalação experimental para estudo da capacidade de retenção de biomassa

Os diferentes suportes são colocados em tubos dispostos paralelamente na zona "S", formando um leito fixo; encheram-se 5 tubos com cada tipo de suporte, num total de 25 e dispuseram aleatoriamente. O sistema funciona dum modo descontínuo, em recirculação total, sendo a velocidade superficial na secção "S" de 62 m/h. O volume total do sistema é cerca de 40 litros e o volume de cada tubo que contém os suportes é de 40 ml aproximadamente.

A temperatura de operação foi mantida a 35 °C através de uma serpentina externa de aquecimento.

Analizou-se diariamente o ácido acético, o pH, e o potencial de oxidação redução. No final da experiência procedeu-se à análise do conteúdo em sólidos voláteis aderidos nos diversos suportes.

2.3 - Substrato e inóculo

A composição do substrato utilizado nos dois tipos de experiências foi a seguinte:

CH₃COOH: 2 g/l; NH₄Cl: 0.22 g/l; K₂HPO₄: 0.20 g/l; MgSO₄.7H₂O: 0.08 g/l; CaCl₂.2H₂O: 0.008g/l; NaHCO₃: 0.32 g/l, extracto de levedura: 0.076 g/l, solução de micronutrientes: 0.8 ml/l. O pH foi mantido próximo de 7 por adição de NaOH.

A solução de micronutrientes tem a seguinte composição: FeCl₂.6H₂O: 2 g/l; H₃BO₃: 0.05 g/l; ZnCl₂: 0.05 g/l; CuCl₂.2H₂O: 0.038 g/l; MnCl₂.4H₂O: 0.5 g/l; (NH₄)₆Mo₇O₂₄.4H₂O: 0.05 g/l; AlCl₃.6H₂O: 0.09 g/l; CoCl₂.6H₂O: 2 g/l; NiCl₂.6H₂O:0.092 g/l; Na₂SeO₃.5H₂O: 0.164 g/l; EDTA: 1g/l, Resazurina: 0.2 g/l; HCl 37%: 1 ml/l.

O inóculo consistiu numa mistura de lamas retiradas dum filtro anaeróbio laboratorial e lamas obtidas dum digestor anaeróbio numa estação municipal de tratamento de águas residuais.

O conteúdo em sólidos suspensos totais do inóculo era 26.3 g/l sendo a fracção volátil 58%. Em ambos os ensaios o volume de inóculo representou 10% do volume total.

2.4 - Métodos analíticos

O ácido acético foi determinado por cromatografia líquida utilizando uma coluna para ácidos orgânicos (Chrompack cat. nº 28350); o eluente usado foi ácido sulfúrico 0.01 N com um caudal de 0.70 ml/min, a temperatura da coluna era 40 °C e a detecção foi feita espectrofotometricamente a 210 nm.

A biomassa aderida aos suportes de vidro e argila (SVA), foi quantificada gravimetricamente por diferença entre o peso do material seco a peso constante a 105 °C, e calcinado a 550 °C. No caso do policarbonato, removeu-se a biomassa do suporte usando uma sonda de ultrasons (Sonics & Materials modelo CV 17) e determinaram-se os sólidos suspensos voláteis do meio líquido resultante, usando o método descrito no Standard Methods of Examination of Water and Wastewater, 1989. Este foi também o método utilizado para determinar a biomassa em suspensão nos dois tipos de experiências.

O pH e o potencial redox foram determinados utilizando eléctrodos da marca Orion e um potenciómetro da mesma marca, modelo 420 A.

2.5 - Microscopia

As observações microscópicas das culturas em suspensão foram feitas num microscópio óptico Zeiss, Auxioscope 20 com contraste de fase.

Todos os suportes testados foram observados, após adesão da biomassa, num microscópio electrónico de varrimento marca Leica Cambridge S360. Para preservar a forma dos microorganismos usou-se um método de fixação que consistiu na lavagem com uma solução de glutaraldeído 3% em tampão cacodilato pH 7.2, durante cerca de 12 horas, e posterior desidratação por lavagem com soluções de etanol de concentração crescente.

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Efeito dos suportes na actividade metanogénica

Após uma adaptação ao substrato durante 10 dias, fez-se uma segunda adição de substrato tendo-se registado o seu consumo ao longo do tempo (Fig. 3).

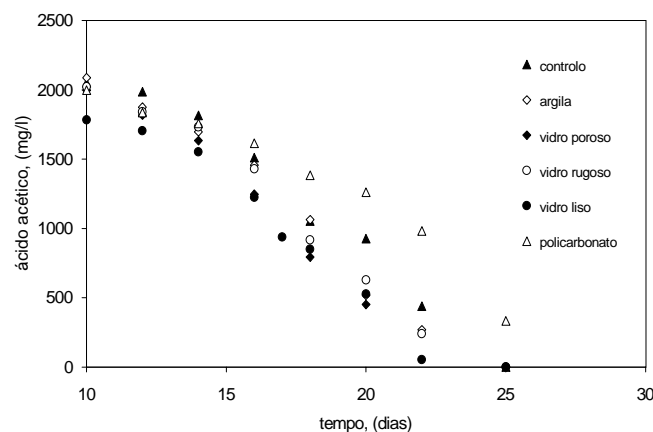


Fig. 3 - Evolução da concentração de substrato nos ensaios com cada suporte e no ensaio controlo (valores médios de dois ensaios)

Convém referir que os ensaios controlo realizados sem biomassa para averiguar a possível adsorção ou volatilidade do substrato, permitiram concluir que não ocorreu nenhum desses fenómenos, uma vez que as variações na concentração de acetato verificadas foram da ordem de grandeza do erro do método analítico utilizado.

A partir dos dados da Figura 3 e dos valores de sólidos voláteis (em suspensão e aderidos) medidos no final dos ensaios, calcularam-se as actividades específicas máximas nos vários ensaios (Tabela II). As diferenças obtidas nestes valores não são consideradas significativas, uma vez que o método de cálculo, por determinação do declive máximo, contribui para um erro considerável nos valores determinados.

Se este facto era esperado no caso dos materiais inertes, no caso da argila vários autores têm descrito efeitos estimulatórios (Murray e Van Den Berg, 1981) e inibitórios (Bonastre e Paris, 1988) atribuídos à passagem de alguns elementos do material para o meio.

Determinou-se periodicamente o pH e o potencial redox. Verificou-se que o potencial redox se mantêve sempre abaixo de -320 mv e que o pH tinha tendência a subir, pelo que se fizeram correcções de modo a manter o seu valor próximo do valor óptimo de pH das espécies presentes. Só são conhecidos dois géneros de bactérias metanogénicas consumidoras de acetato: *Methanothrix* e *Methanosarcina*. O pH óptimo destes dois géneros situa-se entre 7.2 e 7.6 para *Methanothrix* e entre 6.2 e 6.8 para *Methanosarcina* (Wang *et al.*, 1986). Como compromisso, tentou manter-se o pH sempre próximo de 7.

Tabela II - Actividade específica máxima nos ensaios com cada suporte e no ensaio controlo

Ensaio	Actividade máxima (mmoles de Ac/gSSV.dia)
Controlo	2.41
A	2.96
P	2.67
VR	3.04
PC	3.03
VL	2.79

No caso dos suportes porosos e especialmente no vidro, verificou-se que, devido a dificuldades de difusão do gás produzido no interior das partículas, algumas se tornaram flutuantes, facto que pode condicionar a sua utilização em reactores anaeróbios de leito fluidizado. Ainda no caso do vidro poroso, verificou-se que a sua resistência mecânica era extremamente baixa, uma vez que o diâmetro médio das partículas passou de 5.5 mm no início do ensaio para cerca de 3.5 mm no final. Este facto foi também comprovado pela análise dos sólidos suspensos totais e voláteis no fim do ensaio, em que se verificou que a fracção volátil representava apenas 11% dos sólidos suspensos totais contra cerca de 58% nos restantes ensaios. No entanto este material já foi referido como sendo um óptimo suporte para reactores de leito fluidizado (Jördening, 1992).

Durante o ensaio foram feitas observações microscópicas tendo-se verificado a existência de formas microbianas semelhantes a *Methanothrix* e *Methanosarcina* em todos os frascos.

3.2 - Capacidade de retenção de biomassa

Tal como nos ensaios em frasco, procedeu-se a uma prévia adaptação ao substrato, tendo-se registado, o consumo de substrato após uma segunda adição de substrato (Fig. 4). Durante todo o ensaio, registou-se o valor do potencial redox e procedeu-se também a correcções de pH.

No final do ensaio abriu-se a instalação, retiraram-se os tubos, lavaram-se os suportes para eliminar a biomassa que se encontrava retida entre as partículas e determinaram-se os teores em sólidos voláteis aderidos em cada tipo de suporte (Fig. 5). Tal como já referido, e uma vez que se pretendia testar o funcionamento da instalação quanto à sua adequação para fazer estudos comparativos deste tipo, analisaram-se cinco tubos com cada suporte, tendo-se obtido os valores médios registados na Tabela III.

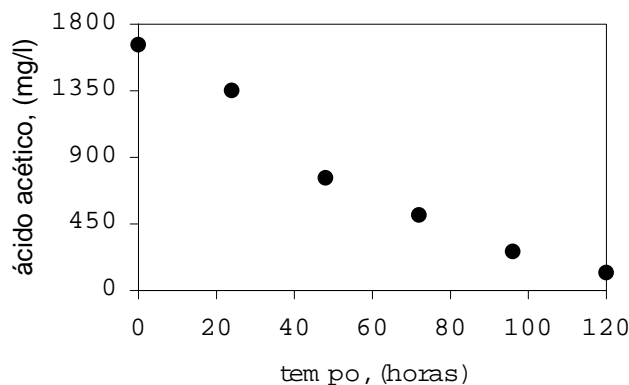


Fig. 4 - Evolução da concentração de substrato no ensaio de adesão

Apesar de se considerar mais adequado representar a biomassa aderida por unidade de volume de suporte, apresentam-se também na mesma tabela os resultados referentes à biomassa aderida por unidade de massa de suporte.

A comparação entre os vários materiais só pode ser efectuada tendo em atenção que a tensão de corte a que os diferentes suportes foram sujeitos durante o ensaio era semelhante. Uma vez que, à excepção do policarbonato, os diâmetros médios das partículas eram muito semelhantes, as porosidades dos leitos eram também da mesma ordem (0.42-0.44), sendo a velocidade intersticial da mesma ordem de grandeza. No caso do policarbonato, apesar de não se poder comparar com os restantes materiais, parece óbvio que este suporte não é adequado para utilizar em reactores de leito fluidizado, dada a pequena quantidade de biomassa que aderiu.

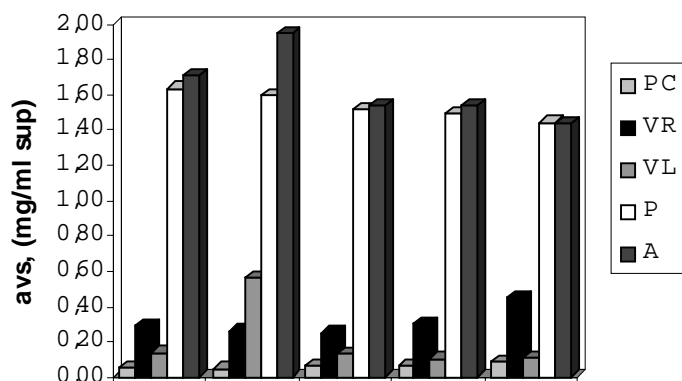


Fig. 5 - sólidos voláteis aderidos nos vários suportes

Da análise da Tabela III constata-se que, tal como esperado, os suportes porosos apresentam maior quantidade de biomassa aderida por unidade de volume ou de massa. Por

outro lado o vidro que sofreu tratamento com EDTA para criar microcavidades na superfície reteve mais do dobro da quantidade de biomassa do vidro liso.

Tabela III - Valores médios dos teores de sólidos voláteis aderidos nos diferentes suportes

Suporte	SVA, (mg/mlsup)	SVA (mg/gsup.)
A	1.64±0.18	4.86±0.52
P	1.54±0.07	10.50±0.39
VR(*)	0.28±0.02	0.21±0.02
VL(*)	0.12±0.02	0.10±0.01
PC	0.06±0.01	0.09±0.02

(*)desprezou-se um valor no cálculo da média e intervalo de confiança

Os intervalos de confiança dos valores médios são bastante estreitos o que significa que a dispersão dos resultados é baixa (max 20% para o policarbonato). Daqui se conclui que a instalação utilizada permite comparar diversos tipos de suporte quanto à capacidade de retenção de biomassa, sendo um método bastante expedito, e pouco trabalhoso a nível laboratorial. No entanto, convém referir que não é possível utilizar os resultados obtidos para prever a eficiência dum reactor anaeróbio de leito fluidizado.

As observações em microscópio electrónico de varrimento permitiram verificar que o tipo de microorganismos mais abundante parece ser do género *Methanothrix* apresentando-se um exemplo na Fig. 6.

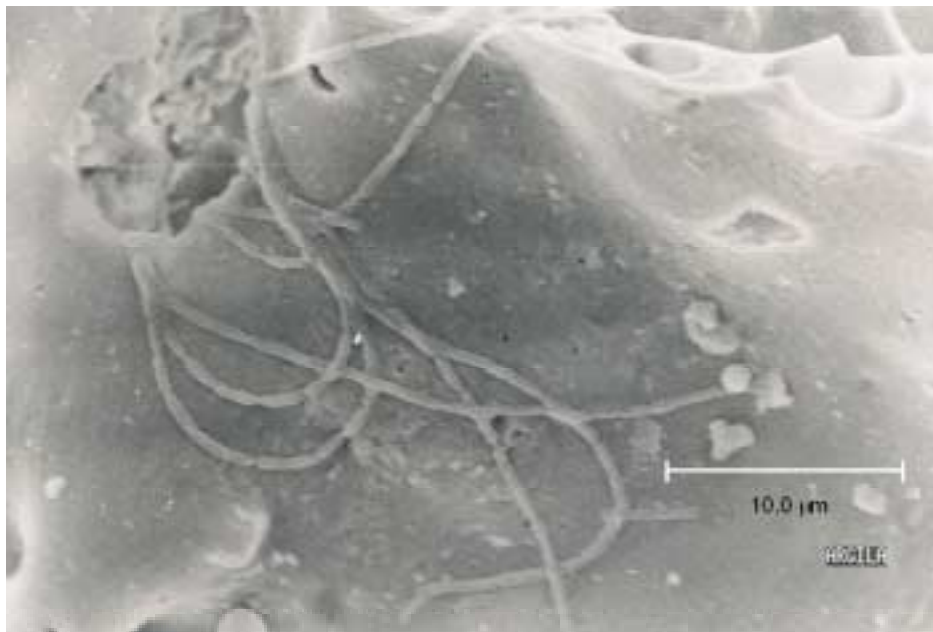


Fig. 6 - Aspecto da superfície da argila após adesão de bactéria filamentosas semelhantes ao Género *Methanothrix*

4 - CONCLUSÕES

Com o presente trabalho concluiu-se que:

- nenhum dos materiais tem efeito na actividade metanogénica;
- a instalação testada permite comparar a capacidade de retenção de biomassa de diferentes suportes;
- o vidro poroso (Poraver) não é mecânicamente resistente;
- dos cinco tipos de suportes testados, a Argila é o que apresenta melhores características para imobilização de biomassa, embora a sua utilização possa ser condicionada pela existência de limitações difusionais.

5 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrews, G.F., (1986), Selecting Particles for Fluidized-Bed Bioreactors with Flocculent Biomass, *Biotechnology Progress*, **2**:1, 16-22.
- APHA, AWWA, WPCF, (1989) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 17th ed., Washington.
- Balaguer, M.D.; Vicent, M.T.; Paris, J.M., (1992) Anaerobic Fluidized Bed Reactor with Sepiolite as Support for Anaerobic Treatment of Vinasse, *Biotechnology Letters*, **14**:5, 433-438.
- Bonastre, N.; Paris, J.M.,(1988), Colonisation and Stimulation/Inhibition Properties of Different Supports Used in Anaerobic Fixed-Film Reactors, *Environmental Technology Letters*, **9**, 763-768.
- Fdz-Polanco, F.; Diez.; V., (1988), Reactores Anaerobios de Lecho Fluidizado Diseño y Operacion, actas del 4º Seminario D.A.A.R., F Fdz-Polanco, P.A. Garcia, S. Hernando, (Eds.), Univ. Valladolid, 170-189.
- Fox, P.; Suidan, M.T.; Bandy, J.T., (1990), A comparison of Media Types in Acetate Fed Expanded-Bed Anaerobic Reactors, *Water Research*, **24**:7, 827-835.
- Heijnen, J.J.; Mulder, A.; Enger, W.; Hoeks, F., (1986) Review on the Application of Anaerobic Fluidized Bed Reactors in Waste-Water Treatment, in Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-up Technology", AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V. Schiedam, 159-174.
- Henze, M.; Harremões, P., (1983) Anaerobic Treatment of Wastewater in Fixed-Film Reactors - A Literature Review, *Water Science and Technology*, **15**, 1-101.
- Huysman, P.; Van Meenen, P.; Van Assche, P.; Verstraete, W., (1983), Factors affecting Colonization of non Porous and Porous Packing Materials in Model Upflow Methane Reactors, *Biotechnology, Letters*, **5**, 643-648.
- Iza, J.; Colleran, E; Paris, J.M.; Wu, W.-M., (1991), International Workshop on Anaerobic Treatment Technology for Municipal and Industrial Wastewaters: Summary Paper, *Water Science and Technology*, **24**:8, 1-16.
- Jeris, J.; McCarty, P.L., (1965), The Biochemistry of Methane Fermentation Using C14 Tracers, *Journal of Water Control Federation*, **37**:2, 143-148.
- Jördening, H.J., (1992), Anaerobic Biofilms in Fluidized Bed Reactors, in Biofilms - Science and Technology, L.F. Melo, T.R. Bott, M. Fletcher and B. Capdeville (Eds.) Nato ASI Series, Kluwer Academic Pub., Dordrecht,
- Meier-Schneiders, M.; Busch, C.; Diekert, G., (1993), The attachment of Bacterial Cells to Surfaces under Anaerobic Conditions, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **38**, 667-673.
- Messing, R.A.; Oppermann, R.A., (1979), Pore Dimensions for Accumulating Biomass.I. Microbes that Reproduce by Fission or by Budding, *Biotechnology and Bioengineering*, **21**, 49-58.
- Murray, W.D.; Van Den Berg, L., (1981), Effect of Support Material on the Development of Microbial Fixed Films Converting Acetic Acid to Methane, *Journal of Applied Bacteriology*, **51**, 257-265.
- Pereira Cardoso, J., (1977), An Investigation of the Factors Affecting Reaction Rates in Immobilized Enzyme Reactors, Ph.D Thesis, Univ. of Birmingham.
- Verrier, D.; Mortier, B.; Dubourguier, H.C.; Albagnac, G., (1988), Adhesion of Anaerobic Bacteria to Inert Supports and Development of Methanogenic Biofilms, in Proc 5th Int. Symp. Anaerobic Digestion, E.R. Hall and P.N. Hobson (Eds.), Pergamon Press, New York, 61-69.
- Wang, S.-D.; Wang, D.I.C., (1988), Pore Dimension Effects in the Cell Loading of a Porous Carrier, *Biotechnology and Bioengineering*, **33**, 915-917.
- Wang, S.-Y. C.; Tseng, I.-C.; Wang, L.C., (1986), The Characteristics of Methanosarcina e methanotrix in an Anaerobic Digester, in Conference Papers of "Anaerobic Treatment a Grown-up Technology", AQUATEC'86, Industrial Presentations B.V., Schiedam, 29-37.
- Yee, C.J.; Hsu, Y.; Shieh, W.K., (1992) Effects of Microcarriers pore Characteristics on Methanogenic Fluidized Bed Performance, *Water Research*, **26**, 1119-1125.
- Yee, C.J., (1990), Effects of Microcarriers on Performance and Kinetics of the Anaerobic Fluidized Bed Biofilm Reactor, Ph.D. Dissertation, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA.