

EFEITO DA DILUIÇÃO NA CARACTERIZAÇÃO DA BIOMASSA DE SISTEMAS DE TRATAMENTOS DE EFLUENTES POR ANÁLISE DE IMAGEM

Da Motta M.^{1,4}, Amaral L.P.², Neves L.², Araya P.², Ferreira E.C.², Alves M.M.², Mota M.², Roche N.³, Vivier H.¹, Pons M.N.¹

1- Laboratoire des Sciences du Génie Chimique, CNRS-ENSIC-INPL

1, Rue Grandville - BP 451 - 54001 Nancy cedex - France

2- Centro de Engenharia Biológica - IBQF - Universidade do Minho

4710-057 Braga - Portugal

3- IUT de Marseille - Génie Chimique Génie des Procédés - EA 884 - Université d'Aix-Marseille

BP 157 - 13388 Marseille cedex 13 - France

4- Departamento de Engenharia Química - CTG - Universidade Federal de Pernambuco

Cidade Universitária - 50740-521 Recife - Pernambuco - Brasil

Telefone: (0-xx-81)3271-8238 – Fax: (0-xx-81)271-0095 – Email: mottas@frevo.npd.ufpe.br

RESUMO – O estudo da biomassa de sistemas de tratamento de efluentes por análise de imagem permite avaliar o seu estado de agregação assim como acompanhar as modificações por ela sofrida quando submetida a choques orgânicos ou hidráulicos. Certos processos de tratamento trabalham com uma forte concentração em biomassa, o que obriga a uma diluição prévia. O presente estudo avalia o efeito desta diluição sobre a caracterização da biomassa aeróbia e anaeróbia (agregada sob a forma de flocos ou grânulos ou isolada). Os resultados obtidos indicam que este efeito varia segundo a origem e tipo da biomassa e o tipo de água utilizada na diluição. Foi observado que a diluição provoca inicialmente um aumento do tamanho dos flocos para em seguida provocar a sua ruptura. Devido a fortes variações sofridas sobretudo em relação à quantificação das bactérias filamentosas, recomenda-se a opção por uma diluição e sua manutenção até o fim do experimento.

PALAVRAS-CHAVE: tratamento de efluentes; análise de imagem; lamas ativadas; digestão anaeróbia.

ABSTRACT – The study by image analysis of biomass in wastewater treatment systems allow us to evaluate its aggregation state and to relate its changes to changes in the process operation conditions. In some processes, a high biomass concentration is used and dilution is necessary for visualisation by optical microscopy. The effect of the dilution factor on the measured characteristics of aerobic and anaerobic bacteria (aggregated as flocs or granules, or isolated) has been investigated. The results indicate that the effect depends on the origin and type of biomass and on the kind of water used for dilution. Dilution induces initially an increase of the floc size. The flocs are disrupted when the dilution factor is high. Due to the observed variations on the quantification of filamentous bacteria, it is recommended to select initially an appropriate dilution factor and to maintain it for the whole experiment.

1. INTRODUÇÃO

A análise de imagem é uma poderosa ferramenta para o estudo da morfologia e fisiologia da biomassa bacteriana e de suas relações com as condições operacionais de

processos no tratamento de efluentes, tanto anaeróbio quanto aeróbio. Esta caracterização permite o estudo do comportamento dos microorganismos (formação de flocos,

contato com tóxicos, etc.). Alves *et al.* (2000) estudaram o efeito de choques orgânicos e hidráulicos na morfologia dos agregados bacterianos num digestor anaeróbio.

No tratamento de efluentes por lamas ativadas as bactérias se aglomeram sob a forma de flocos bacterianos. Estes flocos são formados por bactérias zoogleais (formadoras de flocos) e por bactérias filamentosas, segundo a teoria do esqueleto filamentoso (Jenkins *et al.*, 1993). Um excesso de bactérias filamentosas provoca a formação do "bulking" filamentoso que reduz a velocidade de decantação das lamas no decantador secundário acarretando uma redução do fluxo de água tratada podendo mesmo paralisar a estação de tratamento (Gerardi *et al.*, 1990). Grijspeerdt e Verstraete (1996 e 1997) desenvolveram um sensor em linha, utilizando a análise de imagem, para o clarificador de uma estação de tratamento de esgotos. Este sensor permite estimar a concentração das lamas ativadas pela superfície projetada dos flocos bacterianos. Da Motta *et al.* (2001a) monitoraram por análise de imagem a abundância das bactérias filamentosas, a morfologia dos flocos bacterianos em várias estações de tratamento de efluentes em França e em Portugal e estudaram o efeito destes parâmetros sobre a decantabilidade das lamas. Um procedimento semelhante é proposto por Heine *et al.* (2001).

Vários processos de tratamento de efluentes por via biológica operam com uma elevada concentração de biomassa, sendo necessária uma diluição das amostras para uma posterior análise microscópica. Todavia esta diluição pode produzir alterações nas características morfológicas dos flocos, segregação das bactérias filamentosas livres e sua adesão nos flocos.

Para verificar o efeito da diluição na caracterização da biomassa, foram realizados experimentos nas estações de tratamento de Nancy e Braga e em unidades piloto de lamas ativadas e de digestão anaeróbia.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Foram colhidas amostras da estação de tratamento de efluentes de Nancy-Maxéville (filial urbana e filial industrial), de duas unidades piloto: uma aeróbia (Da Motta *et al.*, 2001b) e uma anaeróbia (Pereira *et al.*, 2001). Para cada uma das amostras foram realizadas diluições de 1:2, 1:5, 1:10 e 1:20. Em seguida foi adquirida uma série de 50 imagens para cada uma das 4 diluições diferentes e para a amostra concentrada de cada unidade.

2.1. Sistema de Aquisição e Análise de Imagem dos Flocos Aeróbios

A Figura 1 mostra o sistema de aquisição utilizado.



Figura 1- Sistema de aquisição de imagens.

Uma gota de cada amostra é colocada numa lâmina e coberta por uma lamela sem nenhuma preparação. Imagens são captadas com auxílio de uma câmara de vídeo (Hitachi CCTV) fixada sobre o microscópio e conectada a um computador por uma placa de aquisição (Matrox). Estas imagens são em seguida tratadas automaticamente com auxílio do programa *FlocMorph* desenvolvido em Visilog[®] v.5 (Noesis, Les Ulis, França). As principais etapas deste programa são apresentadas na Figura 2.

Partindo-se da imagem inicial, melhora-se o contraste e em seguida obtém-se o fundo da imagem que é subtraído para eliminar o gradiente (pré-tratamento). Realiza-se então a binarização da imagem (passa-se de 255 tons de cinza para dois níveis apenas, branco e preto). A partir da imagem binária retira-se os núcleos de floco, etiqueta-se cada elemento e procede-se à identificação dos filamentos.

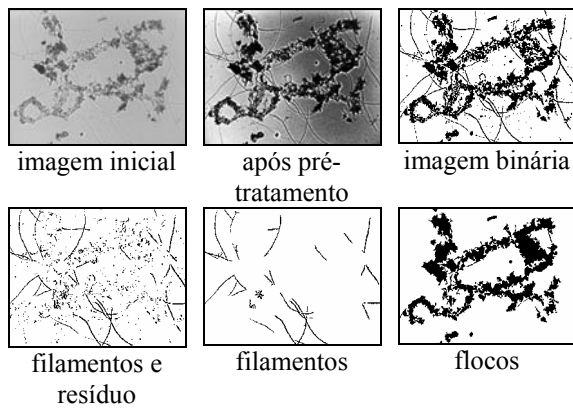


Figura 2 - Etapas do programa *FlocMorph*.

Na penúltima imagem obtêm-se os filamentos, já isolados onde são calculados o número e o comprimento total deles. A discriminação entre flocos, pequenas partículas e bactérias filamentosas (presas ou não aos flocos) é baseada no critério de tamanho. Os objetos que sobreviverem a uma abertura morfológica de ordem 2 (Coster e Chermant, 1989) serão considerados como flocos. A discriminação entre pequenas partículas e filamentos se faz a partir do tamanho e do raio de rotação (r_r) dos objetos.

$$r_r = \frac{\sqrt{M_{2X} + M_{2Y}}}{D_{eq}/2} \quad (1)$$

onde M_{2X} e M_{2Y} são os momentos de segunda ordem e D_{eq} o diâmetro equivalente dos flocos definido pela Equação 2.

$$D_{eq} = 2\sqrt{S_f/\pi} \quad (2)$$

onde S_f é a superfície projetada do floco.

Os objetos de superfície projetada superior a 200 pixels e de raio de rotação superior a 1 são filamentos. Em seguida calcula-se o número e comprimento total dos filamentos. O cálculo do comprimento total é realizado a partir de uma esqueletização da superfície dos filamentos. O comprimento médio dos filamentos é calculado dividindo-se o comprimento total de filamentos por imagem pelo número de filamentos por imagem.

Na última imagem da Figura 2 obtêm-se os flocos, a partir dos quais serão calculadas as superfícies totais dos objetos e

dos flocos e os parâmetros de forma, diâmetro equivalente e dimensão fractal de cada floco. Dentre as diversas maneiras de se calcular a dimensão fractal de um objeto apresentada na literatura, foi escolhido o método proposto por Russ (1995) devido a sua robustez (Da Motta *et al.*, 2001a).

Este procedimento de análise é completamente automático, a partir das imagens adquiridas, e não necessita de nenhum operador, realizando somente a aquisição das imagens, respeitando as regras da mesma. Os resultados obtidos são gravados em arquivos ASCII que podem ser importados por uma planilha de cálculo.

2.2. Sistema de Aquisição e Análise de Imagem dos Flocos Anaeróbios

A análise da biomassa do reator anaeróbio é realizada em duas etapas. Inicialmente adquirem-se as imagens dos flocos utilizando-se para isso um microscópio Axioscop (Zeiss, Oberkochen) com uma ampliação de 100x. Os filamentos são adquiridos por um microscópio Diaphot 300 Nikon (Nikon Corporation, Tokyo) com uma ampliação de 100x. Uma câmara de vídeo CCD AVC D5CE (Sony, Tokyo) é fixada sobre os microscópios e conectada a um computador por uma placa de aquisição DT 3155 (Data Translation, Marlboro), com 768 x 576 pixel por imagem em 256 tons de cinza. O tamanho e os parâmetros morfológicos dos flocos assim como a quantidade e tamanho das bactérias filamentosas são calculadas por dois programas desenvolvidos em Matlab 5.3 (The Mathworks, USA).

Programa dos Flocos Anaeróbios. O fundo da imagem original é subtraído com o fim de eliminar o gradiente causado pela iluminação não uniforme (Figura 3b). Contrariamente a *FlocMorph*, o fundo não é calculado mas adquirido como uma imagem sem a presença da amostra. Em seguida a imagem é binarizada, pequenas lacunas nos flocos preenchidas e todos os objetos inferiores a 3x3 pixels são eliminados (Fig. 3c). Finalmente os objetos na fronteira são eliminados (Fig. 3d).

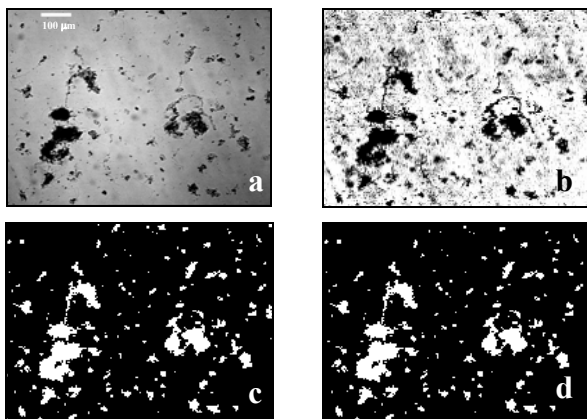


Figura 3 - Imagens do programa dos flocos anaeróbios: imagem original (a); imagem após subtração do fundo e equalização por histograma (b); imagem após binarização (c) e imagem final (d).

Para cada floco presente na imagem são calculados o diâmetro equivalente (Eq. 2), a Superfície Total (S_t) e a superfície dos flocos (S_{tf}), bem como diversos parâmetros de forma e dimensões fractais.

Programa dos Filamentos: O número de filamentos e os comprimentos total e médio dos filamentos por imagem são calculados por este programa cujas principais etapas são apresentadas na Figura 4.

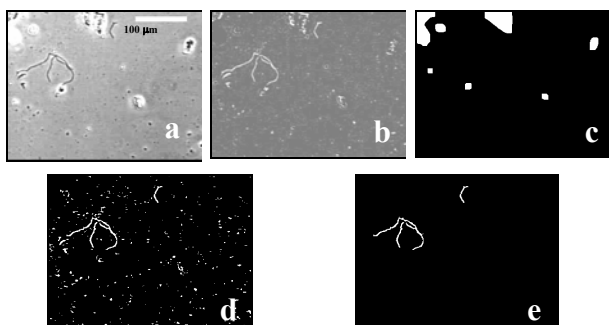


Figura 4 - Imagens do programa dos filamentos: imagem original (a), após aplicar filtro "Bottom-hat" (b), máscara dos flocos (c), imagem após binarização (d) e imagem final (e).

Inicialmente a imagem original é realçada pelo filtro "Bottom-hat" (Russ, 1995), seguido de uma equalização por histograma (Fig. 4c) e aplicação do filtro de média (Fig. 4b). Findo o pré-tratamento a imagem é binarizada por um valor pré-definido (Fig. 4d) e os flocos eliminados (Fig. 4c). Os restantes objetos com comprimento igual a superior a 16 pixels ou um raio de rotação superior a 1.2 são considerados como filamentos (Fig. 4e).

3. RESULTADOS

Inicialmente apresentam-se os resultados do estudo do efeito da diluição sobre as bactérias aeróbias e na segunda parte os resultados sob as bactérias anaeróbias. Cada ponto das figuras representa o valor médio obtido com 50 imagens para cada amostra.

3.1. Flocos Aeróbios

As diluições foram realizadas utilizando-se água da torneira, e as concentrações em SST (Sólidos Suspenso Totais) das lamas ativadas utilizadas foram as seguintes: lamas da filial urbana 2,97 g/L, lamas da filial industrial 2,31 g/L e lamas da unidade piloto 1,20 g/L.

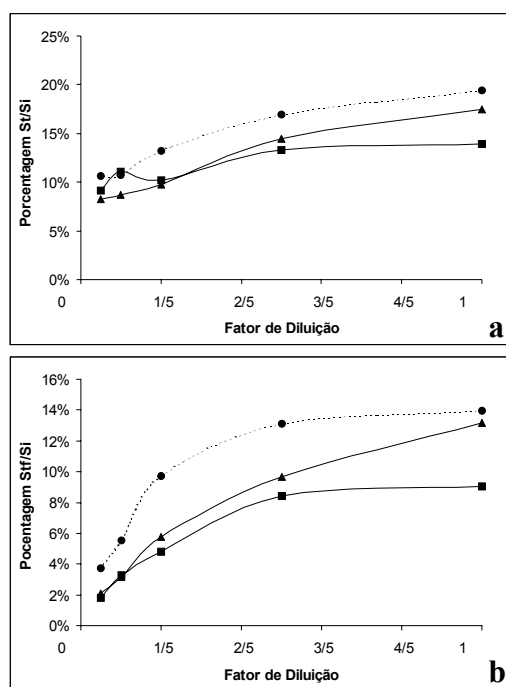


Figura 5 - Variação da porcentagem da superfície total dos objetos (S_t) / total da imagem (S_i) (a) e da superfície total dos flocos (S_{tf}) / total da imagem (S_i) (b) por imagem em função do grau de diluição para o experimento piloto (■) e para as filiais industrial (▲) e urbana (●) da estação de tratamento de esgotos de Nancy-Maxéville.

Os flocos da filial urbana da estação de tratamento de efluentes apresentaram mudanças mais importantes, em relação à diluição (Fig. 6). Um aumento acima de 10% foi observado em relação ao diâmetro equivalente dos flocos (Deq) para um fator de

diluição de 1:2 e de 30% para um fator de 1:5. Em seguida observa-se uma redução devido à quebra dos flocos. Já os flocos de lamas ativadas da filial industrial se fragmentam desde a primeira diluição a 1:2.

Uma questão que poderia surgir é o porquê de os flocos não diminuírem de tamanho quando ocorre uma desfloculação. Ressalte-se que o diâmetro equivalente é calculado a partir da área projetada (em duas dimensão) de um objeto tridimensional. A desestruturação do floco, causada pela desfloculação torna-o menos resistente e durante a preparação (uma gota entre lâmina e lamela) acaba por se "achatar" mais, compensando a perda de biomassa da desfloculação.

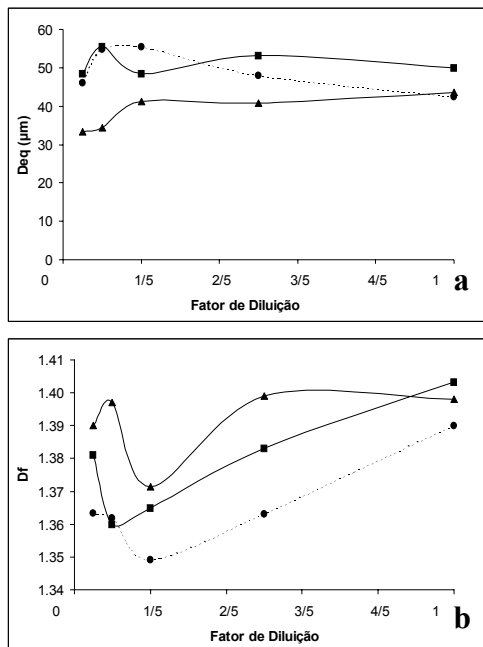


Figura 6 - Variação do diâmetro equivalente dos flocos (D_{eq}) (a) e de sua dimensão fractal (D_f) (b) em função do grau de diluição para o experimento piloto (■) e para as filiais industrial (▲) e urbana (●) da estação de tratamento de esgotos de Nancy-Maxéville.

Em relação à dimensão fractal que representa a rugosidade dos flocos, pode-se observar, a partir da Figura 6b, um comportamento semelhante para os flocos urbanos da estação de tratamento e da unidade piloto. Inicialmente verifica-se uma redução do valor desta dimensão que indica uma suavização da superfície do floco e em seguida, devido a fragmentação do floco, um aumento da rugosidade. Refira-se que a

unidade piloto foi inoculada com lama ativada do canal de recirculação da filial urbana da estação. A rugosidade dos flocos industriais permanece inalterada até um fator de diluição de 1:2; a partir de 1:5 reduz-se (suavização devido à diminuição da resistência dos flocos) para em seguida aumentar (ruptura dos flocos).

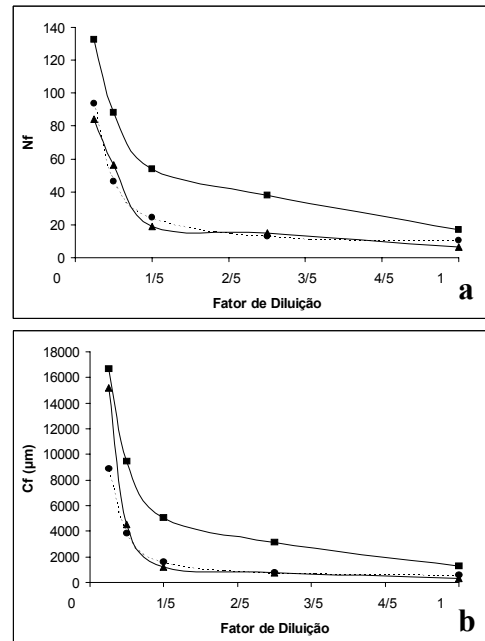


Figura 7 - Variação do número de filamentos (N_f) (a) e do comprimento total dos filamentos (C_f) (b) por imagem corrigido (dividido pelo fator de diluição) em função do grau de diluição para o experimento piloto (■) e para as filiais industrial (▲) e urbana (●) da estação de tratamento de esgotos de Nancy-Maxéville.

Pode-se observar que para diluições acima de 20% há um aumento substancial tanto no número quanto na quantidade de filamentos por imagem. Este fato ocorre devido à saída dos filamentos do interior dos flocos, quando de sua ruptura, e a deficiências do programa *FlocMorph*, que considera pequenos fragmentos ou gradientes de fundo como filamentos. Na realidade este programa está dimensionado para trabalhar com uma taxa de ocupação (relação entre a superfície total dos flocos e a superfície total da imagem) superior a 20%. Entre 20 e 10% pode ser utilizado com uma maior precaução na aquisição das imagens. Abaixo de 10% fatalmente ocorrerão erros induzindo assim um aumento do número e do comprimento total das bactérias filamentosas.

Como referido anteriormente, todas as diluições foram feitas utilizando-se água da torneira. Decidiu-se então utilizar água destilada e água da saída do clarificador da estação de Nancy-Maxéville (água tratada) para comparar o efeito destes diferentes tipos de água quando da diluição da lama ativada.

3.2. Influência do Tipo de Água

Para este estudo foram utilizadas lamas ativadas do canal de recirculação da filial urbana da estação de tratamento de Nancy-Maxéville. As diluições e aquisições foram realizadas em intervalos de oito horas a partir da coleta da amostra, na seguinte ordem: água da torneira, água destilada e água de saída do clarificador.

Tabela 1 - Porcentagem de aumento dos valores dos parâmetros dos flocos [dimensão fractal (D_f) e diâmetro equivalente (D_{eq})] e dos filamentos [número (N_f) e comprimento total (C_f) por imagem] em função da diluição para diferentes tipos de água (solvente).

| Clarificador | D_f | D_{eq} | N_f | C_f |
|--------------|-------|----------|-------|-------|
| 1:1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:2 | 0.5 | 5.8 | 182 | 229 |
| 1:5 | 2.3 | 0.9 | 834 | 1987 |
| 1:10 | 2.1 | 1.1 | 1297 | 3351 |
| 1:20 | 1.3 | -3.2 | 3105 | 8811 |
| Destilada | D_f | D_{eq} | N_f | C_f |
| 1:1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:2 | -2.3 | 24.5 | 76 | 168 |
| 1:5 | -1.3 | 4.2 | 418 | 944 |
| 1:10 | -0.2 | 13.5 | 820 | 2134 |
| 1:20 | 1.0 | 8.8 | 2671 | 9696 |
| Torneira | D_f | D_{eq} | N_f | C_f |
| 1:1 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1:2 | -3.2 | 18.2 | 60 | 130 |
| 1:5 | -2.6 | 18.0 | 351 | 704 |
| 1:10 | -1.1 | 20.6 | 561 | 1327 |
| 1:20 | -0.6 | 0.4 | 1946 | 7566 |

A Tabela 1 apresenta os resultados da variação dos principais parâmetros calculados a partir das imagens. Pode-se assim observar, que contrariamente ao que era esperado, a utilização da água de saída do clarificador não é primordial, tendo em conta a amplitude das modificações causadas pela diluição.

Como na realização de todas as diluições e análises foram necessários dois dias, existe a possibilidade de uma

degeneração das lamas devido ao tempo em que ficou estocada no refrigerador. Para tanto um outro ensaio de diluição com estes três tipos de água foi efetuado. Foram adquiridas imagens das lamas sem diluição e em seguida diluída com um fator de 1:5 para cada tipo de água. Com um número reduzido de diluições podem-se realizar todas as aquisições num tempo inferior a 80 minutos.

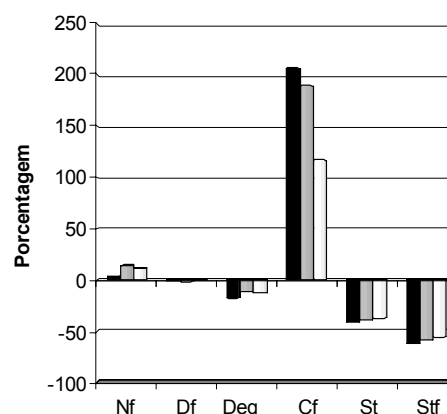


Figura 8 - Variação dos parâmetros corrigidos pelo fator de diluição 1:5 para os três tipos de água: do clarificador (■), destilada (□) e da torneira (□).

Os resultados obtidos anteriormente são confirmados por este novo ensaio para a maioria dos parâmetros estudados. Desta forma podemos sugerir para a realização de diluições a água da torneira. Isto é válido para uma análise imediata após a diluição (até dois dias).

3.3. Flocos Anaeróbios

O mesmo tipo de estudos foi realizado para agregados de biomassa anaeróbia. O efeito da diluição neste tipo de agregados pode depender do grau de granulação dos mesmos. De facto, a biomassa anaeróbia pode-se apresentar com diferentes níveis de agregação a que correspondem diferentes resistências mecânicas. De acordo com Dolfing (1987), existem três tipos de agregados: a) flocos, que são agregados com uma estrutura dispersa e que após sedimentação não podem ser individualizados. b) “pellets”, que são agregados com uma estrutura mais densa do que os flocos e que após sedimentação mantém as características de entidades

individualizadas e c) grânulos que são “pellets” densos. São firmes, suportam uma certa compressão, têm uma elevada velocidade de sedimentação, têm uma forma esférica regular e uma superfície bem definida (Lettinga *et al.*, 1980, Bellouti *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos para os flocos anaeróbios encontram-se expostos nas Figuras 9 e 10.

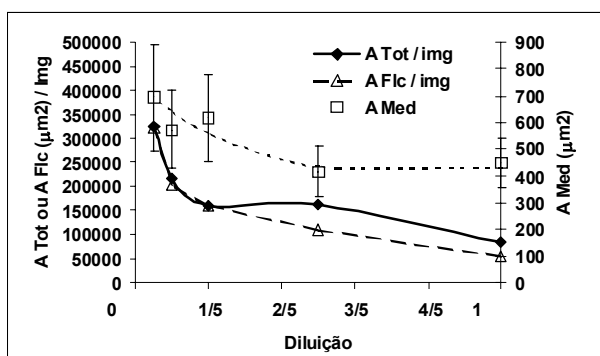


Figura 9 - Variação da área total e área dos flocos por imagem e da área média dos flocos com a diluição.

Observou-se uma tendência de aumento da área total, da área dos flocos e da área média dos flocos com o aumento da diluição (Fig 9). Os valores referentes à área total e área dos flocos podem indicar que, a diluições menores ocorre uma sobreposição dos flocos, obtendo-se por isso valores que podem estar subvalorizados. Contudo, é preciso notar que, quanto maior é a diluição, mais os valores obtidos se tornam dependentes de uma efectiva representatividade entre as imagens adquiridas e a realidade (devido ao menor número de flocos), o que pode nem sempre ser verdade. A existência de um patamar para a área total pode, no entanto, indicar um valor óptimo para as diluições a serem utilizadas.

Em relação à área média dos flocos verificou-se uma tendência de aumento com o aumento das diluições. Este facto é explicado pela eliminação dos flocos que se encontram na fronteira que é mais susceptível de acontecer a flocos maiores ou sobrepostos como no caso das diluições menores. Contudo, e admitindo que não haja

interferência da diluição no tamanho de cada floco individual esse fenómeno deixaria de ocorrer a partir de uma certa diluição, o que não é contudo muito evidente pela análise da Figura 9.

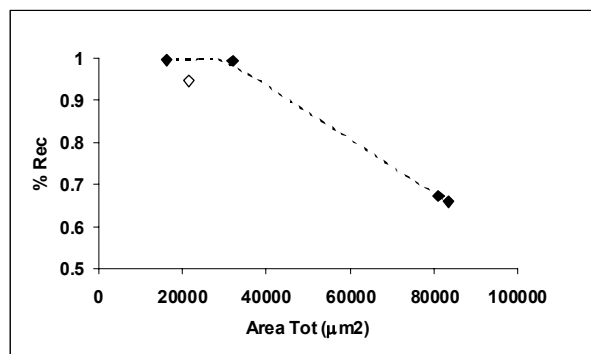


Figura 10 - Variação da percentagem de reconhecimento dos flocos com a área total dos flocos na imagem.

Analisando a importância do preenchimento da imagem na percentagem de reconhecimento dos flocos (i.e. percentagem dos flocos que não tocam a fronteira da imagem), verifica-se uma diminuição deste com o aumento da área total dos flocos na imagem (Fig. 10). Este facto era previsto podendo-se retirar a partir do gráfico uma diluição ou conjunto de diluições para o qual a percentagem de flocos na fronteira é mínima, logo existe um máximo de informação que pode ser retirado de cada imagem.

Os resultados referentes aos filamentos encontram-se representados nas Figuras 11 e 12.

Analisando a Figura 11 verifica-se que tanto o número de filamentos como o comprimento total por imagem aumenta ligeiramente até à diluição de 1:10 e depois bruscamente na diluição de 1:20. Mais uma vez se ressalva o facto de que, quanto maior é a diluição, mais os valores obtidos se tornam dependentes da representatividade entre as imagens adquiridas e a realidade (devido ao menor número de filamentos).

Comparando com os resultados obtidos para os flocos nota-se uma menor dependência dos resultados com a diluição,

sendo por isso, os resultados obtidos por esta técnica mais robustos com a diluição para os filamentos do que para os flocos.

Os resultados da diluição 1:2 revelaram-se bastante diferentes das tendências verificadas, tendo sido por isso desprezados para a determinação das mesmas.

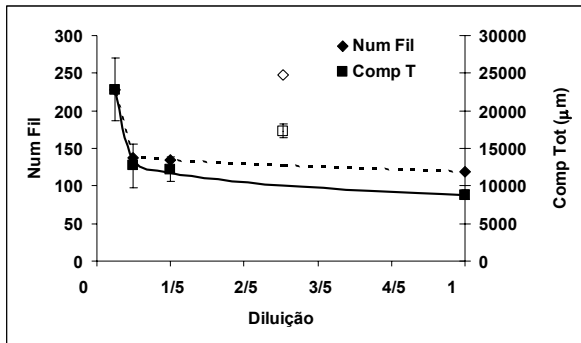


Figura 11 - Variação do número de filamentos e do comprimento total por imagem com a diluição.

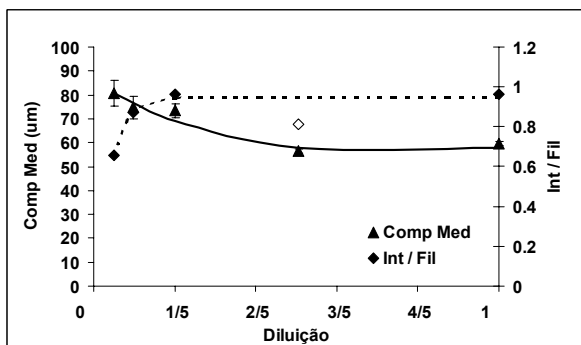


Figura 12 - Variação do comprimento médio dos filamentos e do número de intersecções entre filamentos por filamento com a diluição.

Analisando a Figura 12 verificou-se uma tendência de aumento do comprimento médio dos filamentos com o aumento das diluições, o que pode indiciar uma libertação dos filamentos dos flocos com o aumento da diluição.

O número de intersecções entre filamentos por filamento diminui com o aumento da diluição. Este facto era esperado, uma vez que à medida que a diluição aumenta, tanto os flocos como os filamentos dispersos no meio ficam mais afastados, logo a possibilidade de os filamentos se cruzarem é menor.

De notar ainda que, para todos os resultados obtidos se verificou um aumento dos erros com o aumento da diluição.

4. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos indicam que o efeito da diluição nos flocos aeróbios varia segundo a origem e tipo da biomassa e o tipo de água utilizada na diluição. Foi observado que a diluição provoca inicialmente um aumento do tamanho destes flocos para em seguida provocar a sua ruptura. O programa *FlocMorph* apresentou um bom desempenho para concentrações acima de 0,5 g/l. Foi verificado que o tipo de água utilizada não tem uma influência significativa na diluição das amostras.

Em relação aos flocos anaeróbios, observou-se uma tendência de aumento da área total, da área dos flocos e da área média dos flocos com o aumento da diluição. Comparando com os resultados obtidos para os flocos nota-se uma menor dependência dos resultados com a diluição, sendo por isso, os resultados obtidos por esta técnica mais robustos com a diluição para os filamentos do que para os flocos.

Devido a fortes variações sofridas sobretudo em relação à quantificação das bactérias filamentosas, recomenda-se a opção por uma diluição e sua manutenção até o fim do experimento.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores gostariam de expressar os seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil e à Fundação para a Ciência e a Tecnologia de Portugal pelo financiamento de bolsas de doutoramento, assim como à Embaixada de França em Portugal e ao Instituto de Cooperação Científica e Tecnológica Internacional de Portugal pelo apoio a um projeto de cooperação bilateral Portugal - França.

6. BIBLIOGRAFIA

- ALVES, M.M., CAVALEIRO, A.J., FERREIRA, E.C., AMARAL, A.L., MOTA, M., DA MOTTA, M., VIVIER, H., PONS, M.N. Characterisation by image analysis of anaerobic microbial aggregates under shock conditions. *Wat. Sci. Tech.*, v. 41 (12), p. 207-214, 2000.
- BELLOUTI, M., ALVES, M.M., NOVAIS, J.M., MOTA, M. Floccs vs granules: differentiation through fractal dimension. *Water Research*, 31:5, 1227-1231, 1997.
- COSTER, M., CHERMANT, J.L., Précis d'analyse d'images, 2^e édition, CNRS Editions, Paris, 1989.
- DA MOTTA, M., PONS, M.-N. ROCHE, N., Characterization of activated sludge by automated image analysis, *Bioch. Eng. J.*, artigo em impressão, 2001a.
- DA MOTTA, M., PONS, M.N., ROCHE, N. Automated monitoring of activated sludge in a pilot plant using image analysis, *Wat. Sci. Tech.*, v. 43 (7), p. 91-96, 2001b.
- DOLFING J. Microbiological aspects of granular methanogenic sludge. *Ph.D. Thesis, Agricultural University Wageningen, The Netherlands*, 1987.
- GERARDI, M.H., HORSFALL, F.L., et al. Wastewater biology: the microlife, *A Special Publication, Water Environment Federation, Virginia*, 1990.
- GRIJSPEERDT, K., VERSTRAETE, W. A sensor for the secondary clarifier based on image analysis, *Wat. Sci. Tech.*, v. 33(1), p. 61-70, 1996.
- GRIJSPEERDT, K., VERSTRAETE, W. Image analysis to estimate the settleability and concentration of activated sludge, *Wat. Res.*, v. 31 (5), p. 1126-1134, 1997.
- HEINE, W., SEKOULOV, I., BURKHARDT, H., BEHRENDT, J., Early recognition of poor sludge due to filamentous organism by image analysis, *3rd IWA International Specialized Conference on Microorganisms in Activated Sludge and Biofilm Process, Rome (CD Rom)*, 2001.
- JENKINS, D., RICHARD, M.G., DAIGGER, G.T., Manual on the causes and control of activated sludge bulking and foaming, *Lewis Publishers, 2nd Edition, Michigan*, 1993.
- LETTINGA G., VAN VELSEN A. F. M., HOBMA S. W., DE ZEEUW W., KLAPWIJK A. Use of upflow sludge blanket (USB) reactor for biological wastewater treatment, especially for anaerobic treatment. *Biotechnol. Bioeng.* 22, 699-734, 1980.
- PEREIRA, M.A., MOTA, M., ALVES, M.M. Sequencing adsorption and degradation cycles towards the methanization of oleic acid: comparison between granular and suspended sludge. *9th World Congress on Anaerobic Digestion, Proceedings Part 1, Antwerpen, Belgium, Technological Instituut*, 605-610, 2001.
- RUSS, J.C., The image processing handbook, 2nd ed., *CRC Press, Boca Raton*, 1995.