



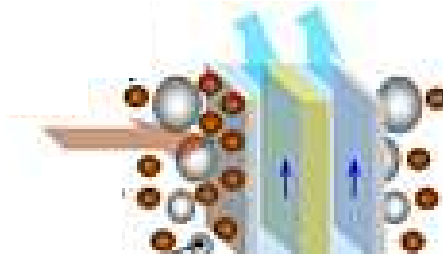
Università degli Studi di
Napoli Federico II



Università degli
Studi di Palermo



Università degli
Studi di Salerno



Corso di Aggiornamento

BioMAc 2013

Bioreattori a Membrane (MBR) per la depurazione delle Acque

Caratteristiche microbiologiche della biomassa dei sistemi MBR

Dr. V. Tandoi, CNR-IRSA Roma

Dr.ssa C. Levantesi, CNR-IRSA Roma

Dr.ssa M.L. Luprano, CNR-IRSA

Dr.ssa D. D'Andrea, CNR-IRSA

Palermo, 4-5 Luglio 2013

Analisi comunità microbiche impianti MBR ed CAS

Obiettivo: Analisi comunità microbiche in impianti MBR in confronto a quelle di impianti tradizionali a fanghi attivi (CAS)

- attività della biomassa (Metodica FISH , rapporto EUB/DAPI)
- presenza di batteri filamentosi (Analisi morfologica)
- struttura e dimensione fiocchi (Analisi morfologica)
- popolazione di batteri nitrificanti (quantificazione mediante FISH)

IMPIANTI MBR DI TRATTAMENTO IN SCALA REALE SITUATI IN ZONA
TURISTICA E SOGGETTI A VARIAZIONI STAGIONALI DEL CARICO

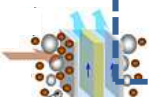
SORRENTO

impianto con membrane a fibre piane Kubota
0,4 μm (microfiltrazione)

CAPRI/ ANACAPRI

impianto con membrane a fibre cave Siemens
0,04 μm (ultrafiltrazione)

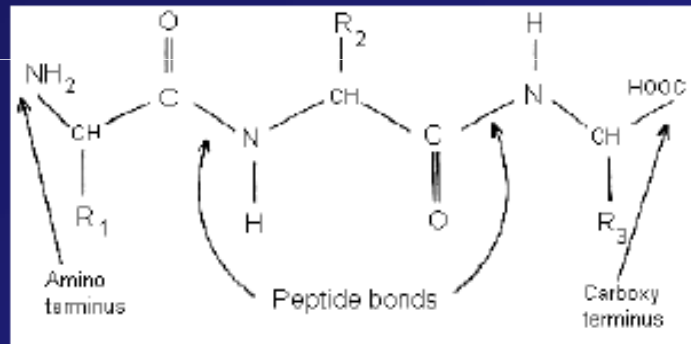
le caratteristiche della biomassa di questi sistemi sono state confrontate con quelle di impianti
convenzionale situati in zone limitrofe (CAS Sorrento e CAS Capri/ Anacapri)



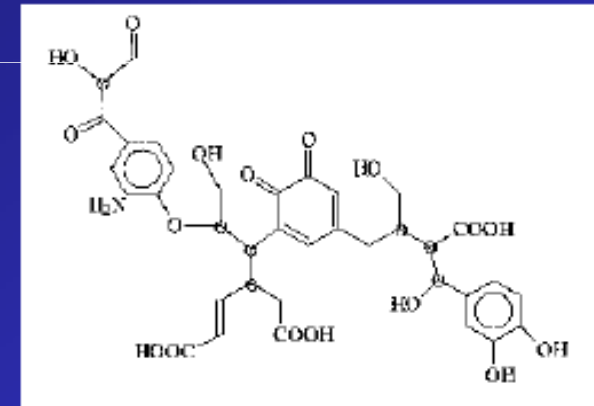
Extracellular Polymeric Substances (EPS)

Main EPS components

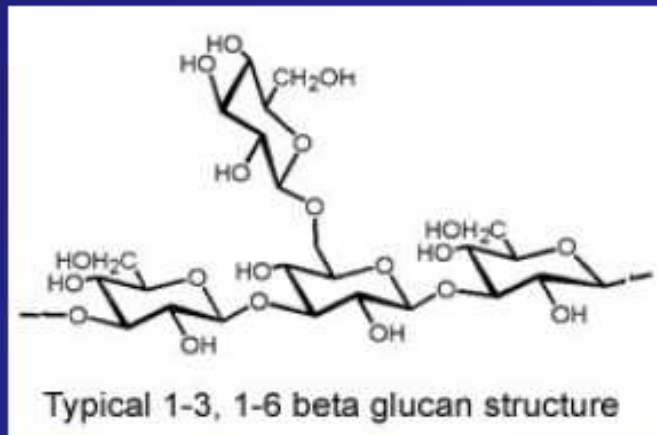
Proteins



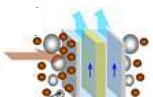
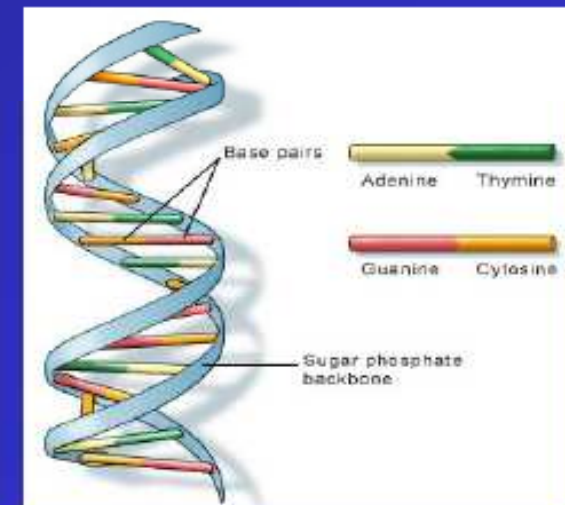
Humic acids



Carbohydrates



DNA



EPS analysis

Chemical analysis:

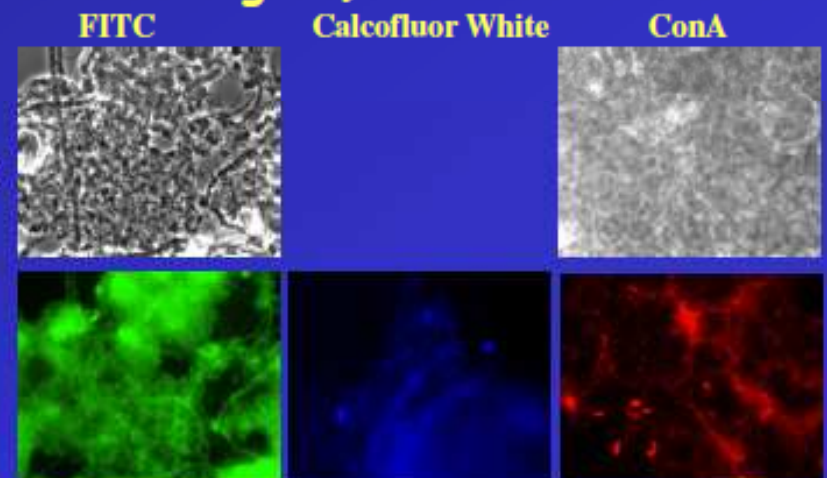
- Quantification after cell lysis (i.e. Formaldehyde+NaOH, Sonication, Heating)
- Quantification after without cell lysis (i.e. cation exchange resin)

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM) analysis:

- Concanavalin A (specific binding on α -glucans)
- Calcofluor White (specific binding on β -glucans)
- FITC (specific binding on aminoacids and aminosugars)

Traditional microscopy analysis:

- Indian ink test



Estrazione EPS

Table 2

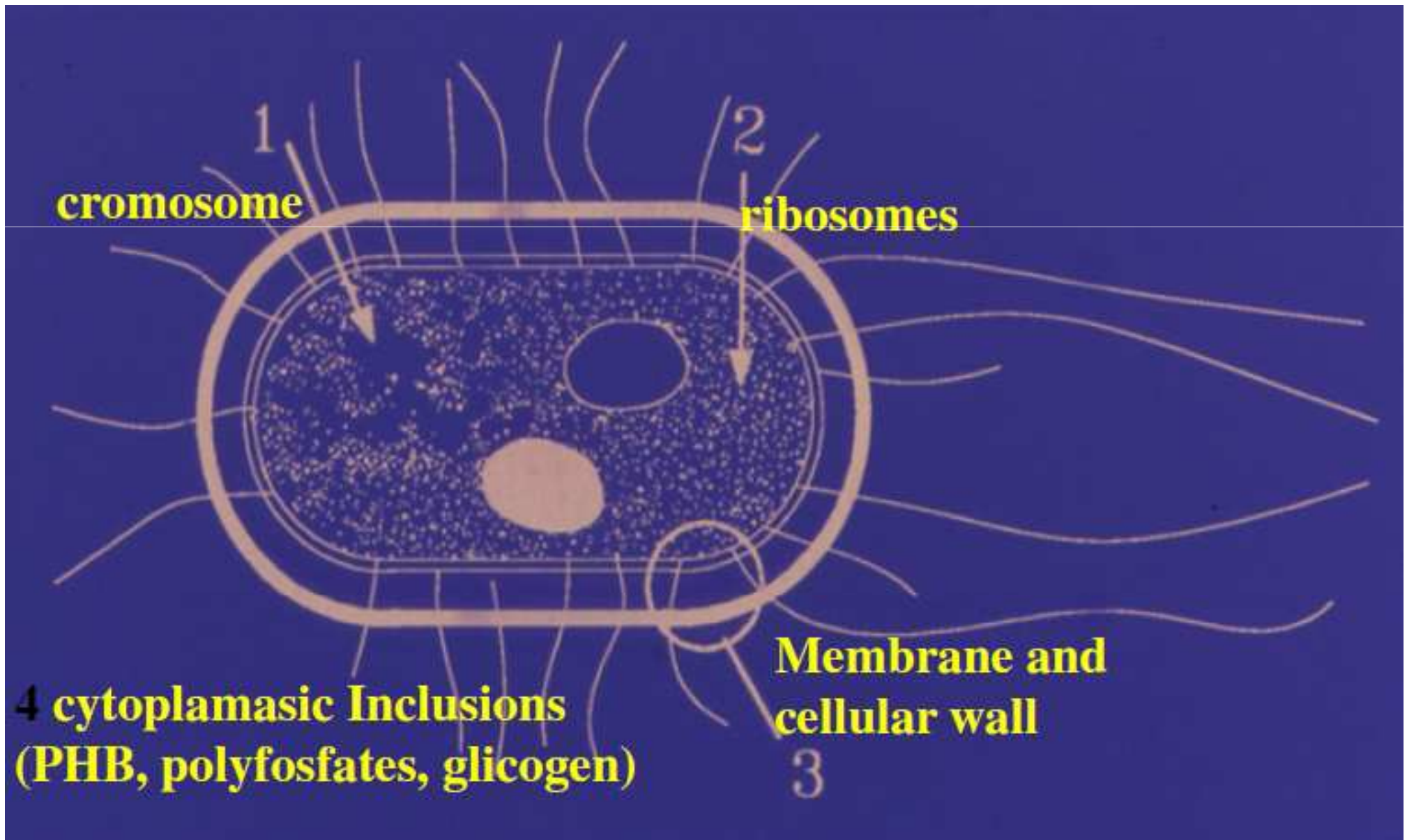
Yields (for the different extraction methods used) in % (DW EPS/ TSS sludge) and quantities of EPS (milligrams of EPS in DW per gram of sludge in VSS)

Extraction method used	EPS sample	Yield (%)	Quantities of EPS (milligrams of EPS DW per gram of sludge VSS)
Control	A	0.8 ± 0.1	16 ± 1
	B	1.0 ± 0.1	21 ± 1
EDTA	A	19.3 ± 1.0	96 ± 5
	B	19.2 ± 1.0	100 ± 5
Formaldehyde + NaOH	A	39.0 ± 2.0	284 ± 14
	B	47.0 ± 2.4	318 ± 16
Glutaraldehyde	A	25.1 ± 1.3	160 ± 8
	B	17.3 ± 0.9	113 ± 6
Sonication	A	1.9 ± 0.1	27 ± 1
	B	2.3 ± 0.1	33 ± 2
Resin	A	2.5 ± 0.1	21 ± 1
	B	3.1 ± 0.2	23 ± 1
Sonication + resin	A	3.7 ± 0.2	30 ± 2
	B	2.7 ± 0.1	30 ± 2
Heating	A	3.6 ± 0.2	62 ± 3
	B	4.1 ± 0.2	64 ± 3

Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods

S. Comte, G. Guibaud, M. Baudu, *Enzyme and Microbial Technology* 38 (2006)

The procaryotic bacterial cell

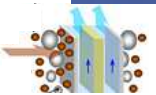


Filamentous bacteria identification

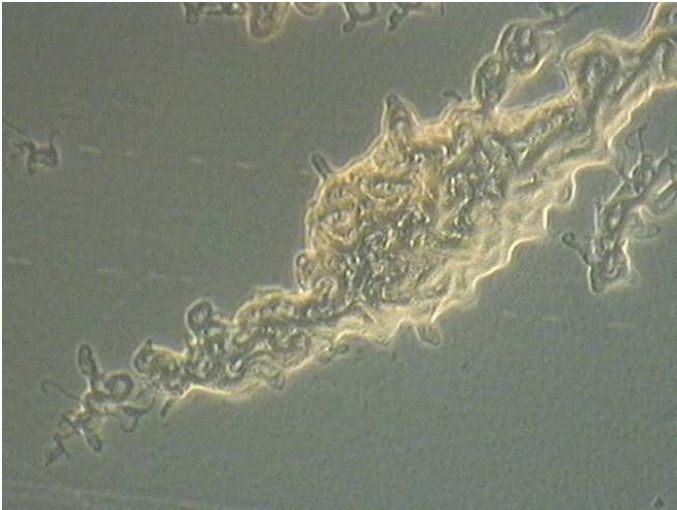
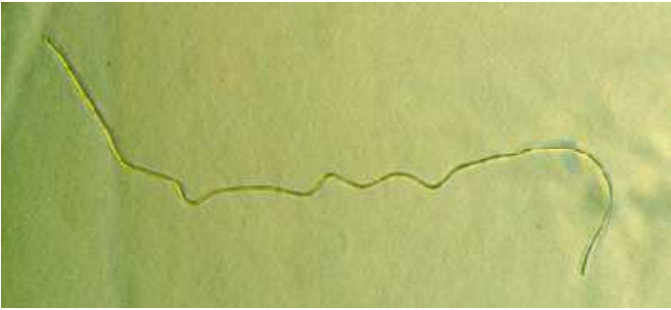
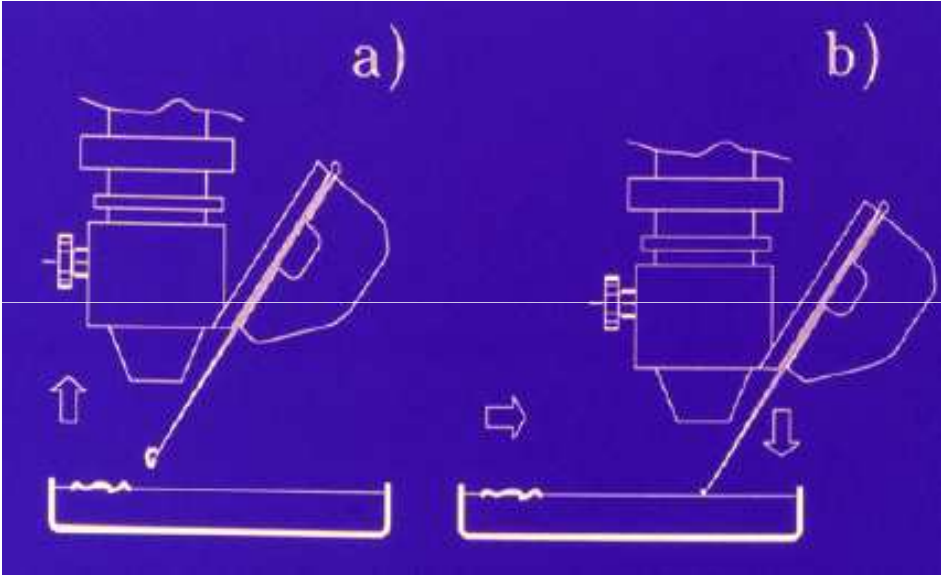
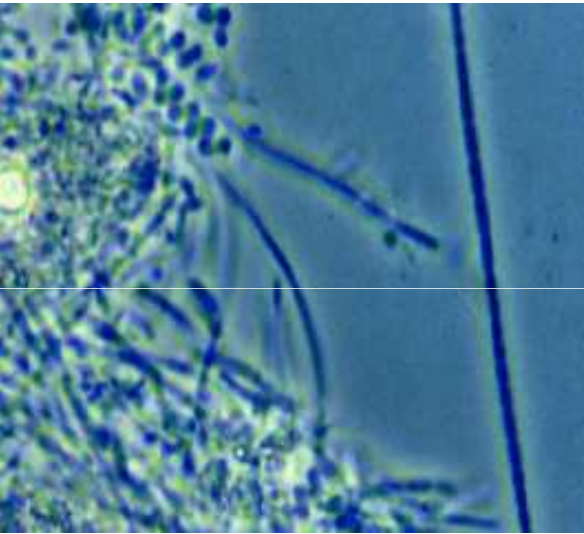
Morphotype Approach : bacteria identified on morphological properties

Type 021 N (Dick Eikelboom, 1975)

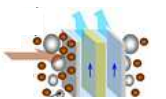
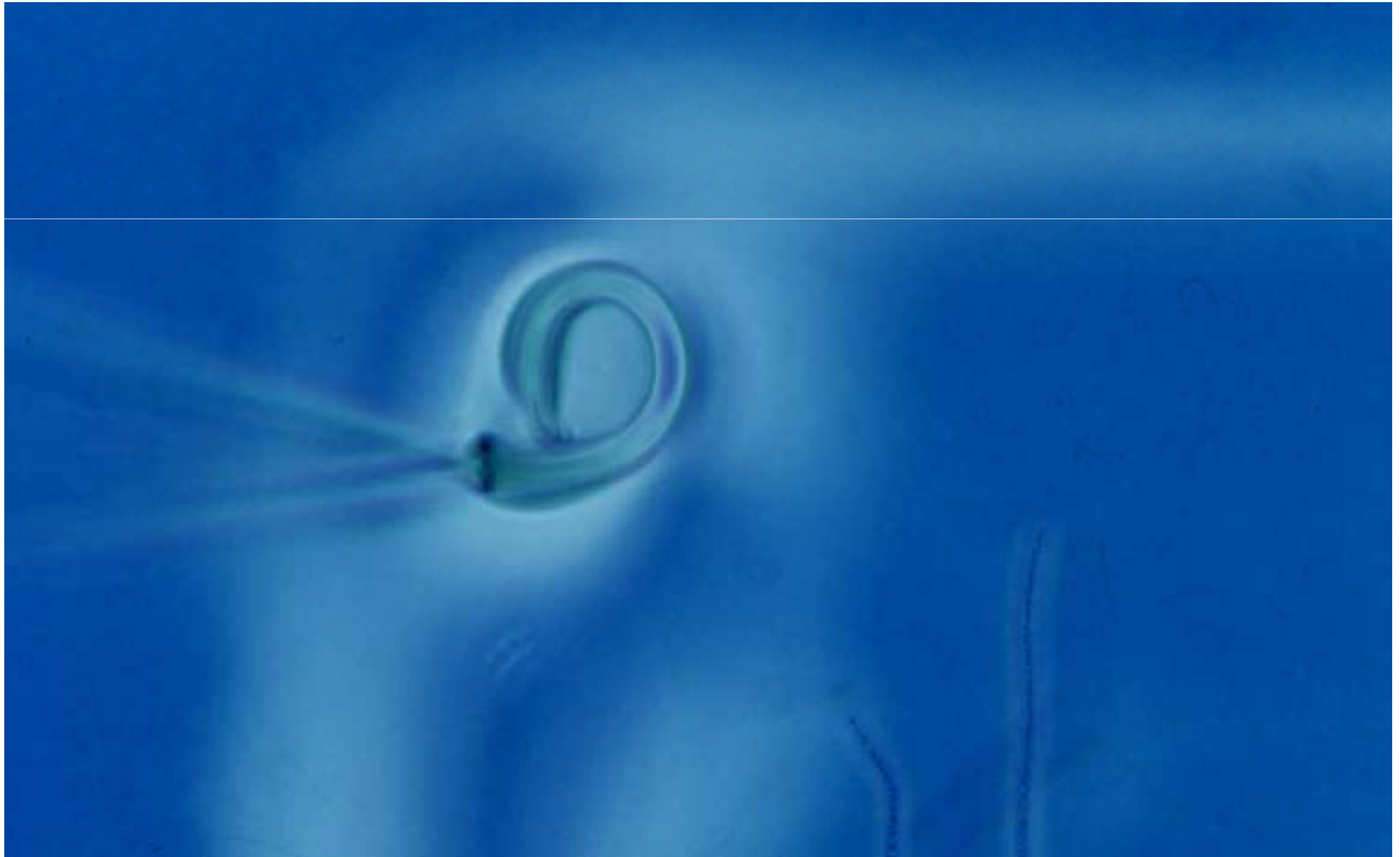
Thiothrix eikelboomii (1999)



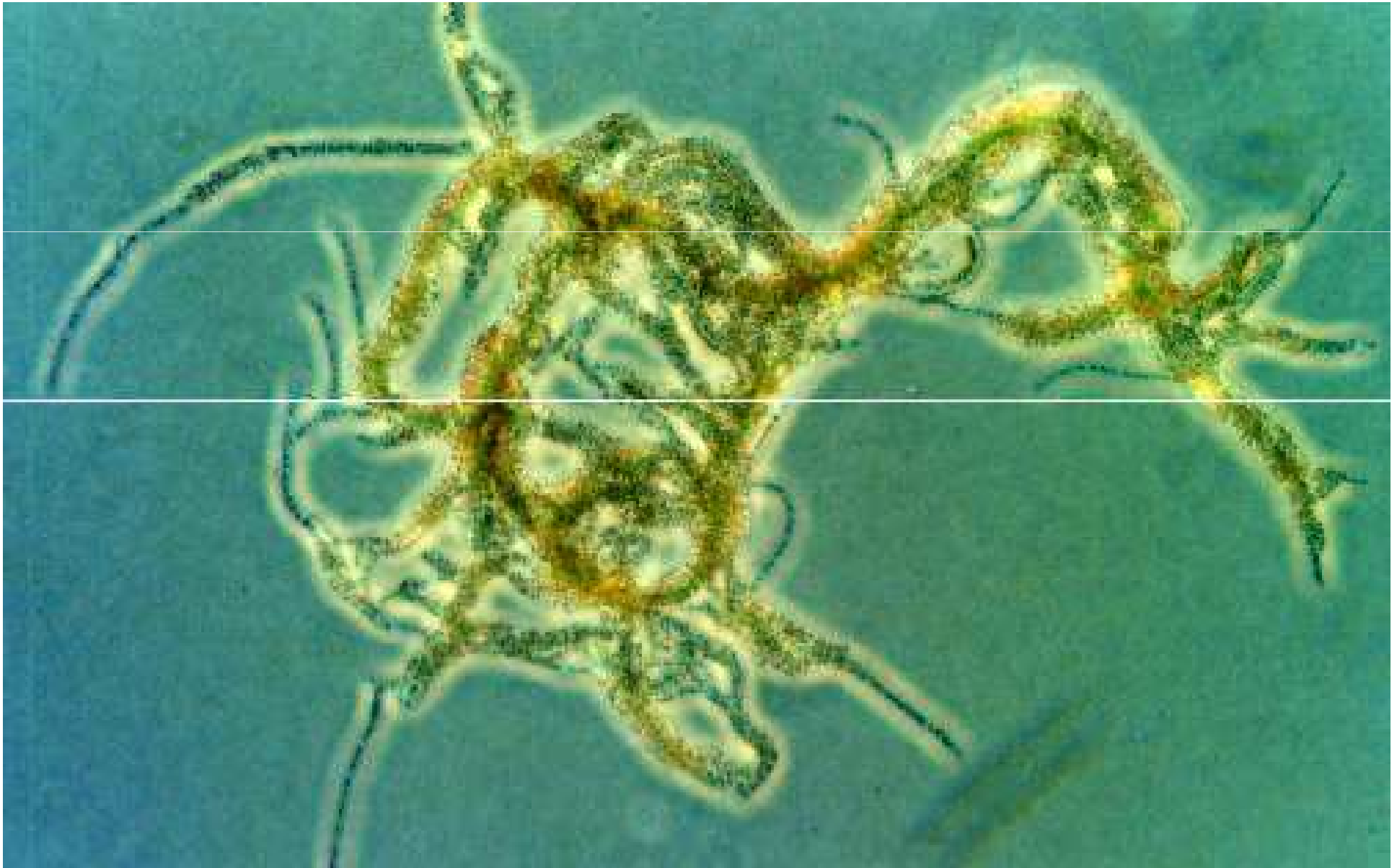
Isolation by micromanipulation, a very elegant and effective technique



Direct isolation of filament by micromanipulation

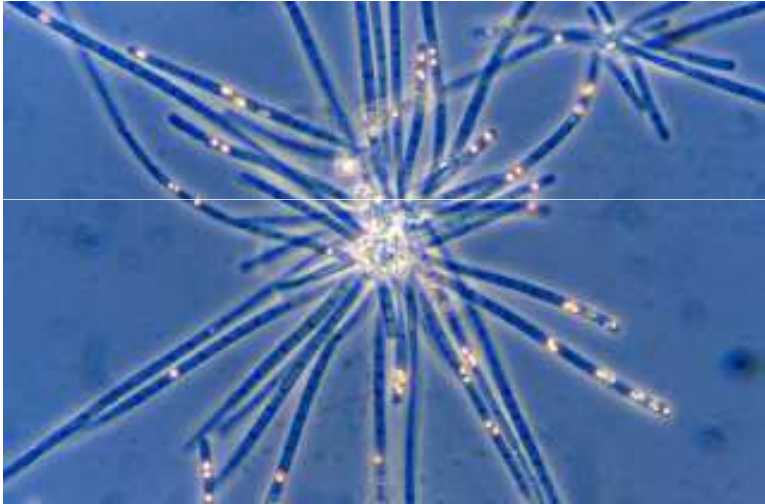


Thiotrix colony CT3 (FC, 400 X, , isolated at CNR IRSA, 1994)

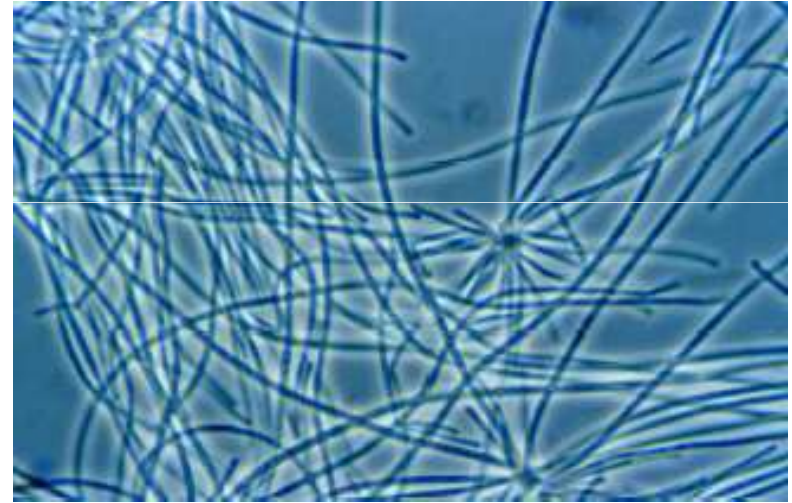


Batteri filamentosi

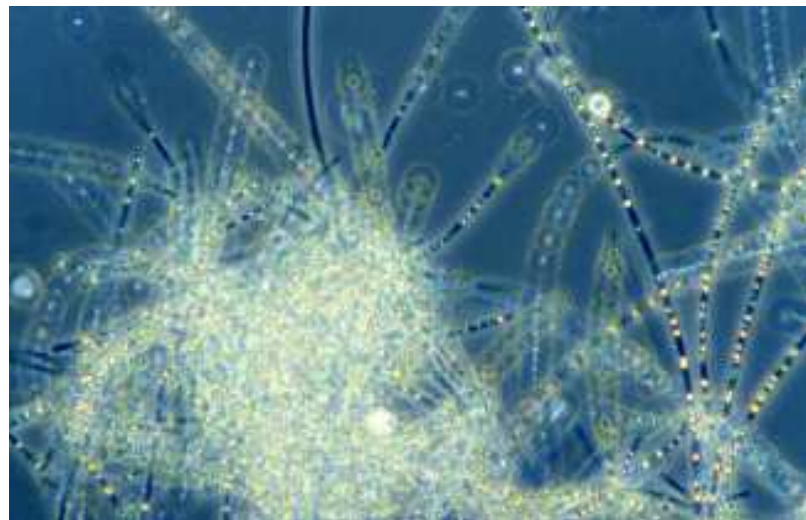
Mixotrophic growth



Eterotrophic growth

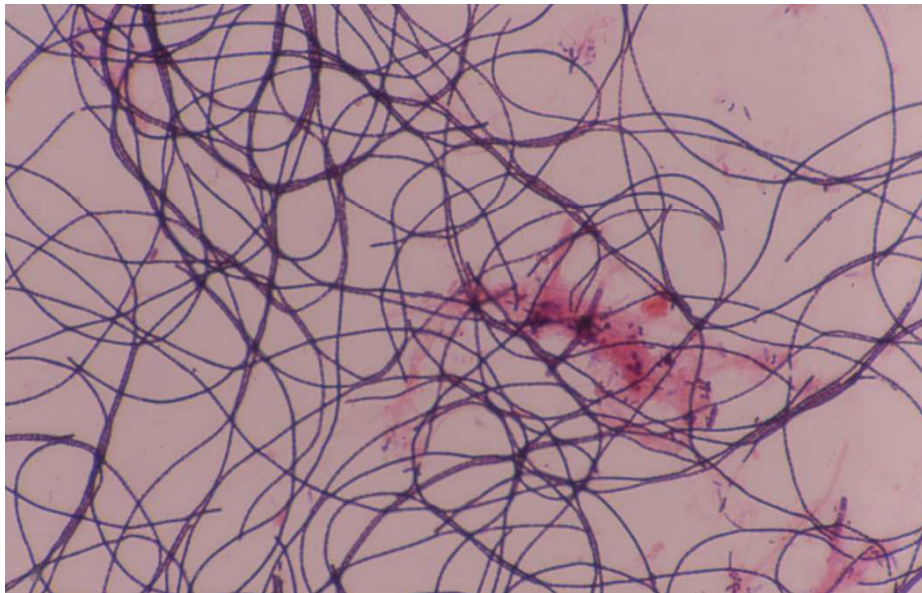
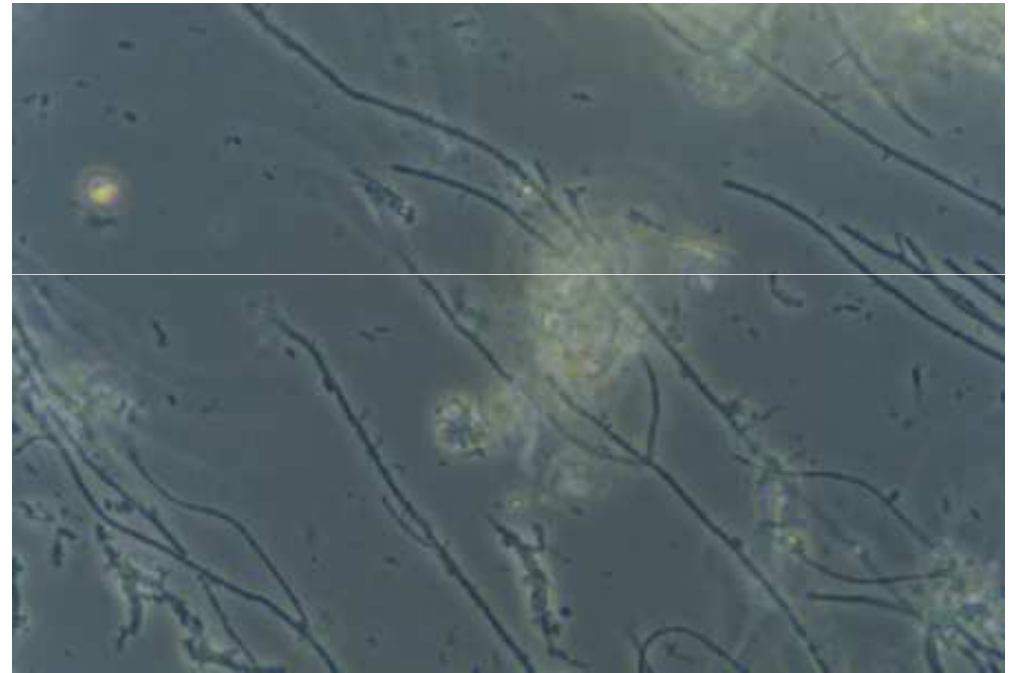


Autotrophic growth

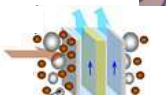


Microthrix parvicella

PC1000 X



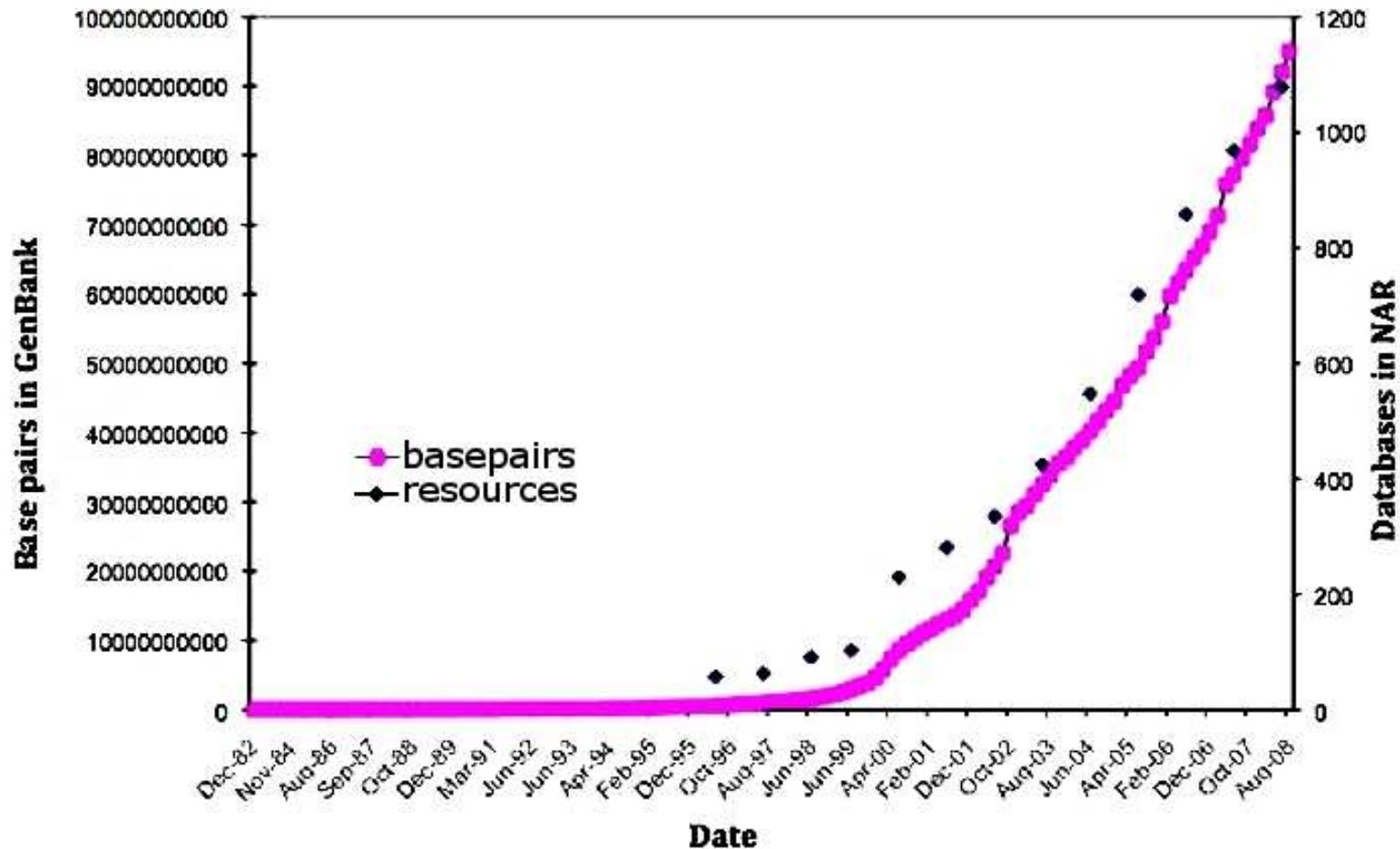
Gram 1000 X



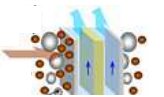
Genbank sequence

The phenomenal growth of sequence data in GenBank is challenging to manage, and continues unabated.

Growth of Sequences & Databases

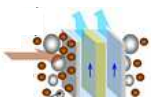
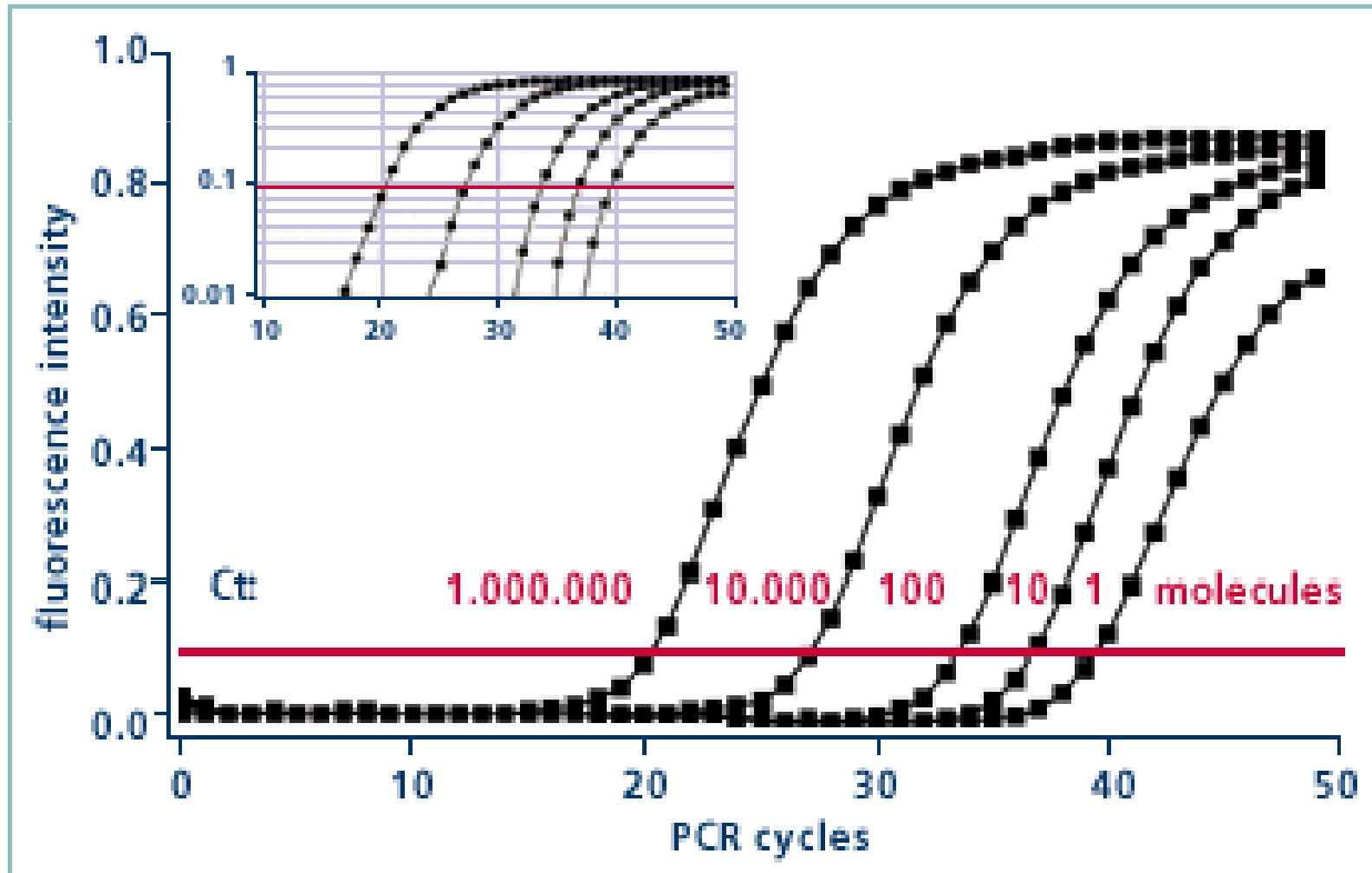


2008, Nature Education



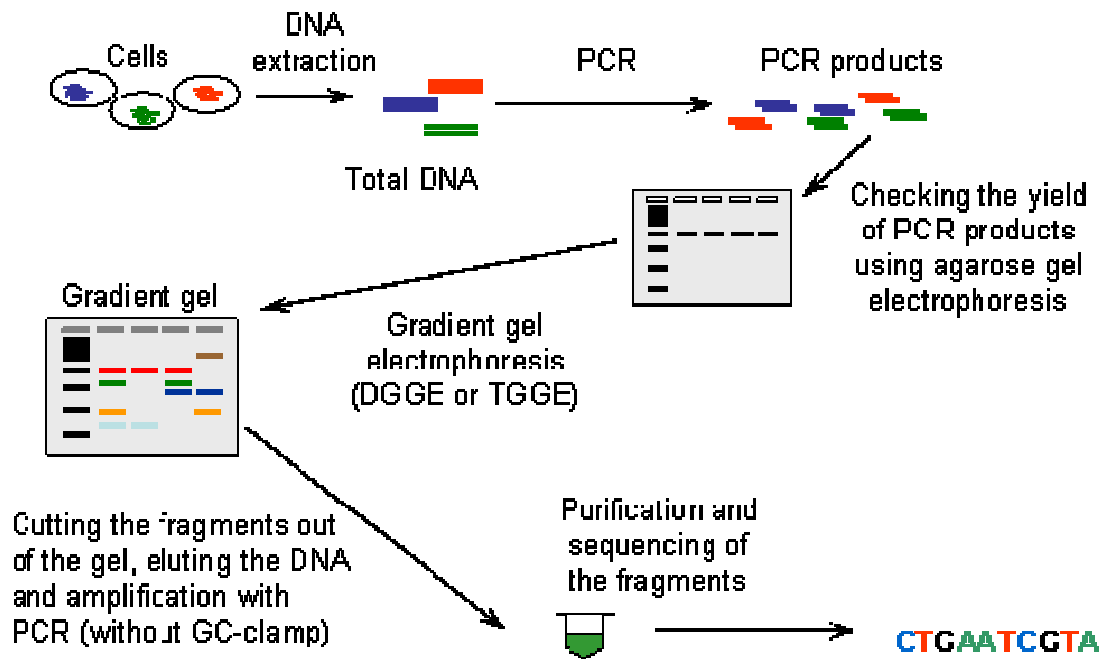
qPCR

Stima quantitativa del gene di interesse, e quindi del microrganismo target



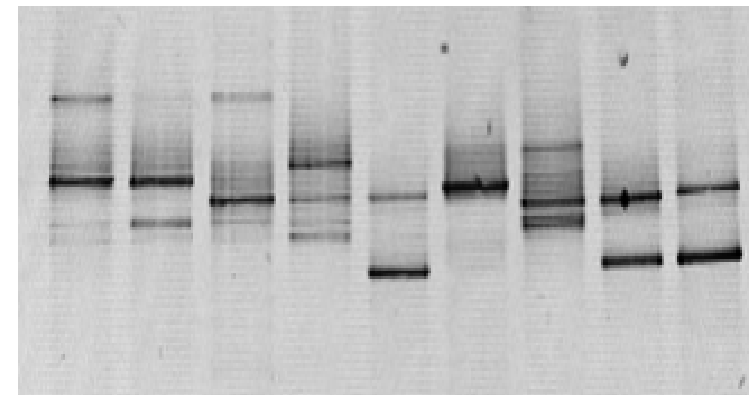
Metodiche *fingerprinting*

Stima semi-quantitativa dell'abbondanza di ogni variante genica

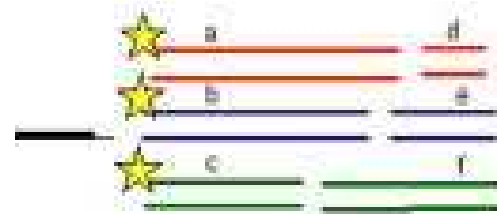


PCR-DGGE

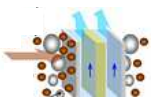
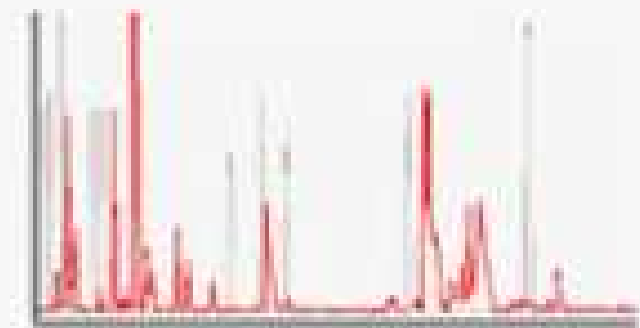
PCR-TGGE



T-RFLP

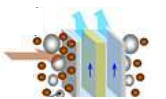
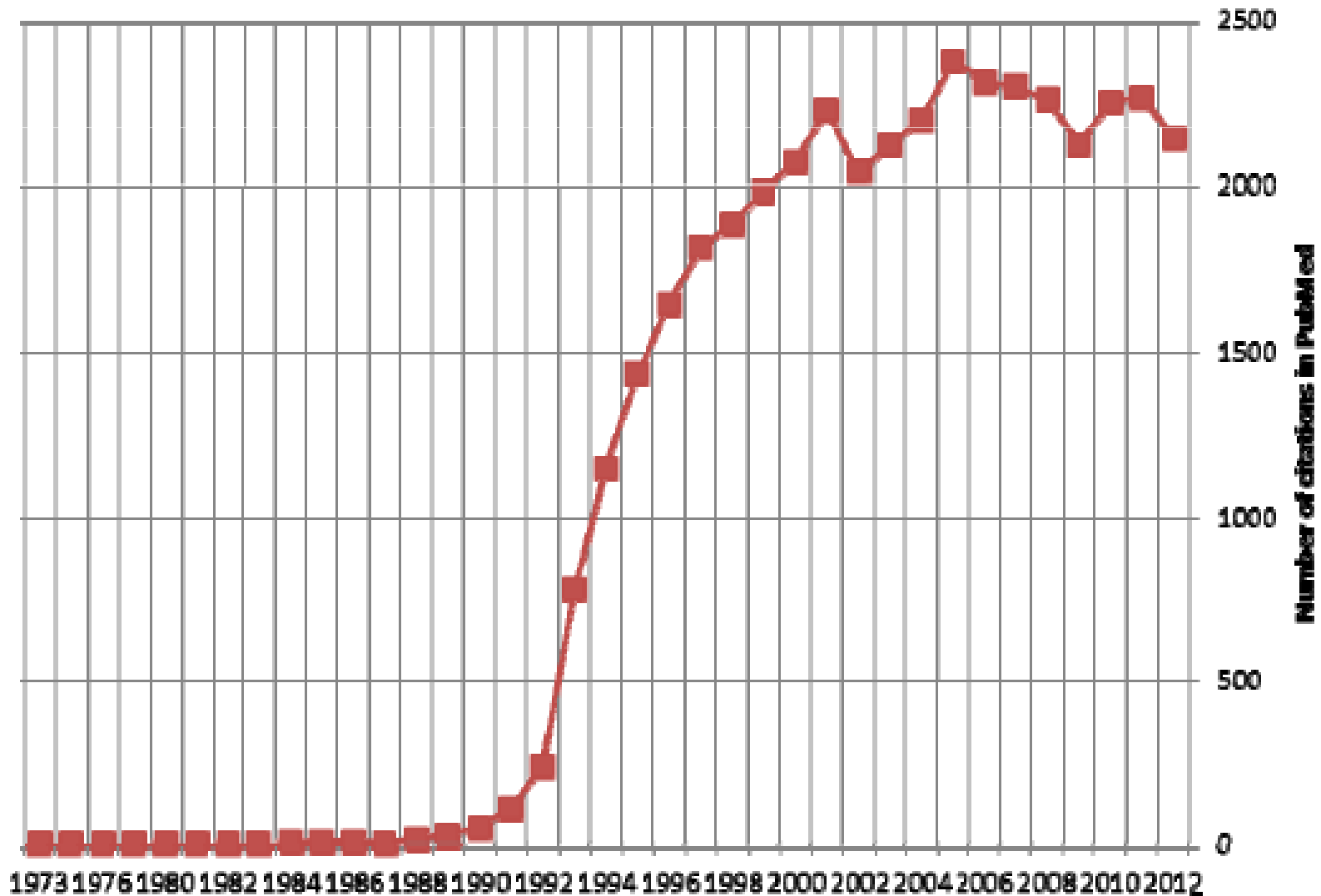


Separation of fragments in polyacrylamide gel electrophoresis



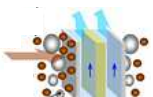
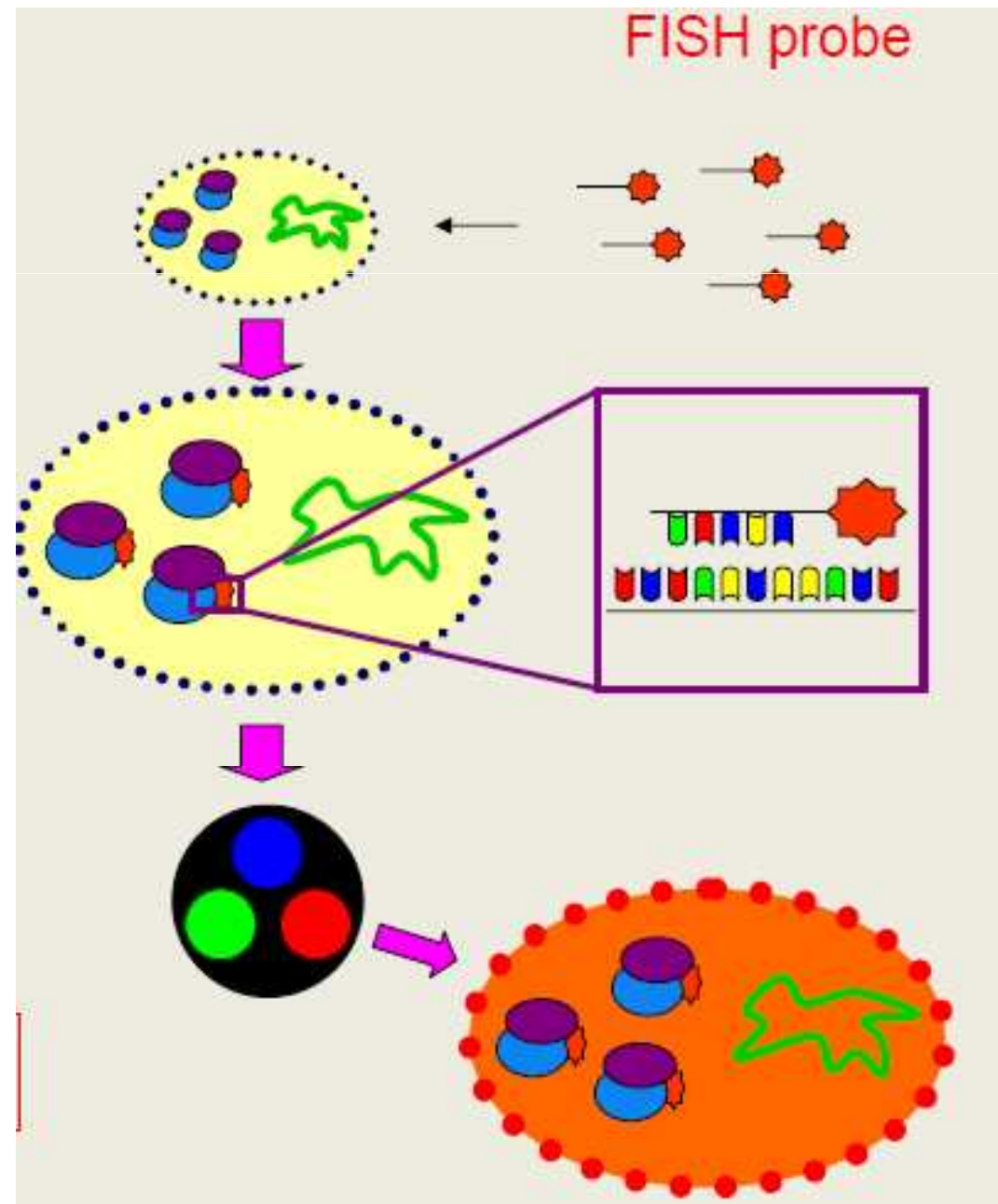
FISH (Fluorescence *In Situ* Hybridization)

Number of citations in PubMed database for the key-word «Fluorescence In situ Hybridization» by publication year



Fluorescence signal intensity is strictly dependent on rRNA content

1. Probes enter the cell
2. They hybridize to the complementary target sequence in the ribosome
3. The hybridised cells can be visualised under epifluorescence microscopy



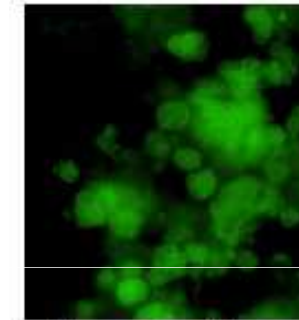
Application of FISH in wastewater treatment

1. Identification of microbial functional groups:

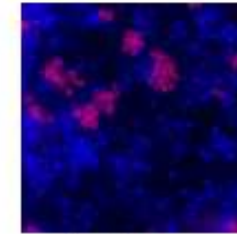
- Nitrifiers
- Polyphosphate accumulating bacteria (PAO)
- Glycogen accumulating bacteria (GAO)
- Anammox microorganisms
- Denitrifiers
- PHA accumulating bacteria

2. Identification of «fastidious bacteria»:

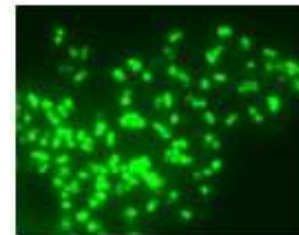
- Filamentous bacteria: bulking and foaming



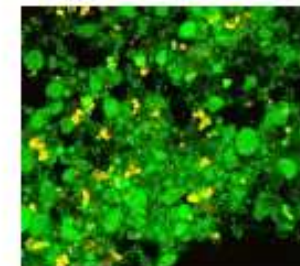
Ammonia oxidizers



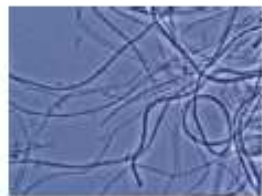
Denitrifiers



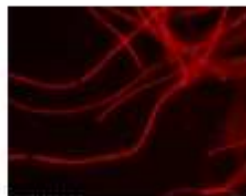
Anammox



GAOs: yellow
Bacteria: green



Thiothrix spp.



Acinetobacter spp.



AlphasNostocoida

Analisi comunità microbiche impianti MBR ed CAS

Obiettivo: Analisi comunità microbiche in impianti MBR in confronto a quelle di impianti tradizionali a fanghi attivi (CAS)

- attività della biomassa (Metodica FISH , rapporto EUB/DAPI)
- presenza di batteri filamentosi (Analisi morfologica)
- struttura e dimensione fiocchi (Analisi morfologica)
- popolazione di batteri nitrificanti (quantificazione mediante FISH)

IMPIANTI MBR DI TRATTAMENTO IN SCALA REALE SITUATI IN ZONA
TURISTICA E SOGGETTI A VARIAZIONI STAGIONALI DEL CARICO

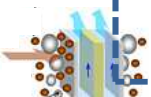
SORRENTO

impianto con membrane a fibre piane Kubota
0,4 μm (microfiltrazione)

CAPRI/ ANACAPRI

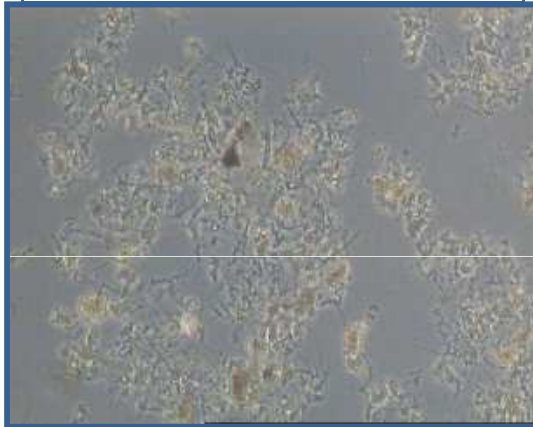
impianto con membrane a fibre cave Siemens
0,04 μm (ultrafiltrazione)

le caratteristiche della biomassa di questi sistemi sono state confrontate con quelle di impianti
convenzionale situati in zone limitrofe (CAS Sorrento e CAS Capri/ Anacapri)



Struttura e dimensione dei fiocchi

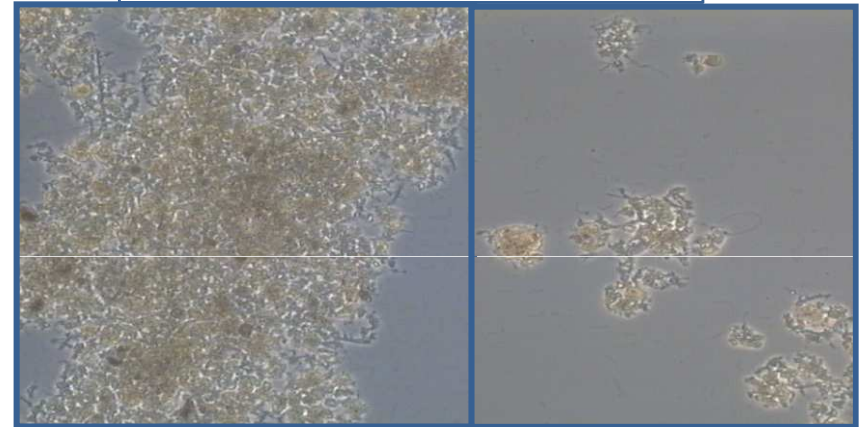
MBR/SORRENTO



BIOMASSA POCO AGGREGATA

i batteri sono organizzati prevalentemente in fiocchi piccoli (<50/100µm) irregolari e deboli

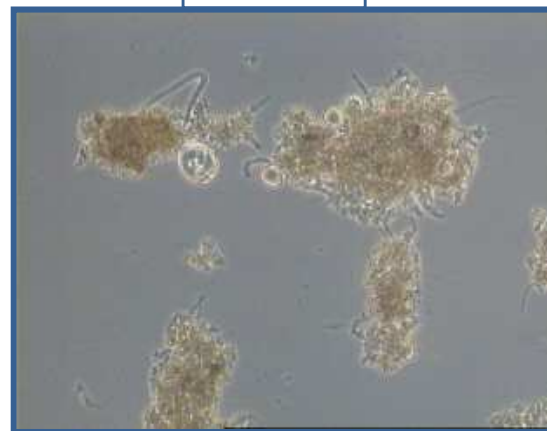
MBR/CAPRI-ANACAPRI



MORFOLOGIA E STRUTTURA VARIA

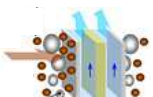
i batteri sono organizzati sia in fiocchi piccoli (<50-100µm) che in aggregati di grandi dimensioni (>500/100µm) o compatti e fermi o irregolari e deboli

CAS

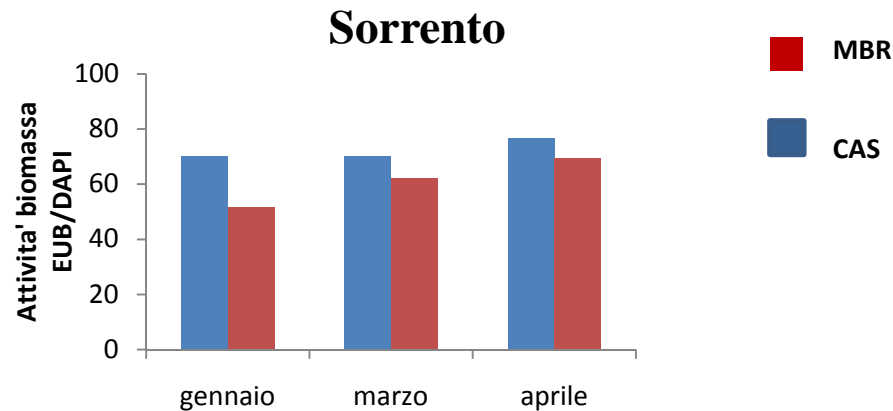


Caratteristici fiocchi di fango attico di medie dimensioni fermi arrotondati e compatti

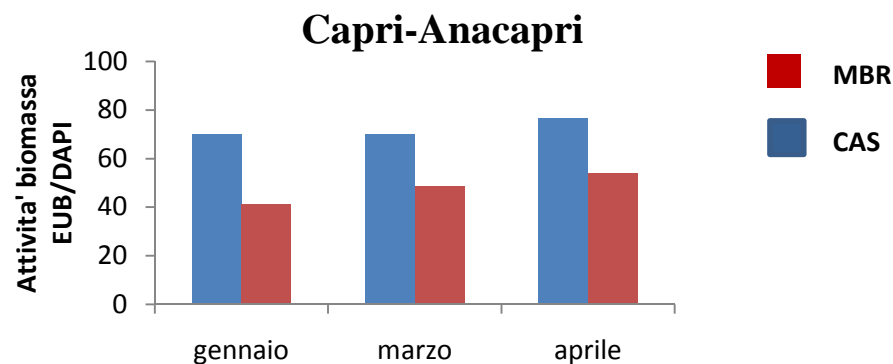
- Le caratteristiche dei fiocchi dei due impianti a membrana sono differenti da quelle di un fango, con buona capacità di sedimentazione, di un impianto a fanghi attivi convenzionale
- Non si osserva uniformità tra i due impianti MBR per la struttura e dimensione dei fiocchi
- Differentemente da quanto solitamente noto si osservano aggregati di grandi dimensioni nell'impianto MBR di capri anacapri



Attività della biomassa: % Eub/Dapi

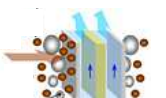


SORRENTO	CAS (% EUB/DAPI)	MBR (% EUB/DAPI)
Gennaio	70,2 ± 0,8	51,7 ± 1,7
Marzo	70,0 ± 2,0	62,2 ± 3,1
Aprile	76,8 ± 1,5	69,4 ± 2,9



CAPRI -ANACAPRI	CAS (% EUB/DAPI)	MBR (% EUB/DAPI)
Gennaio	64,1 ± 0,9	41,3 ± 0,2
Marzo	63,8 ± 0,9	48,8 ± 0,8
Aprile	70,2 ± 1,8	54,2 ± 1,2

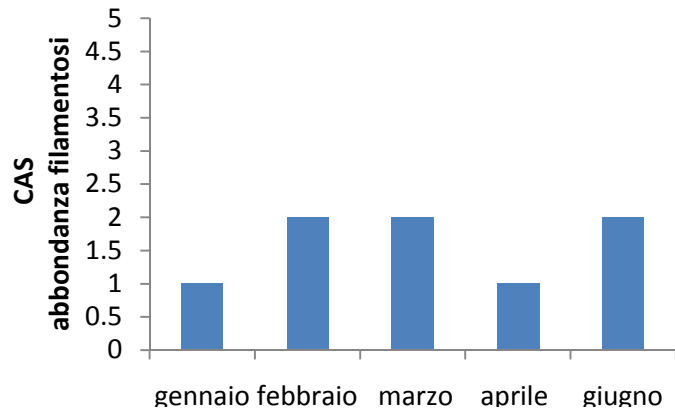
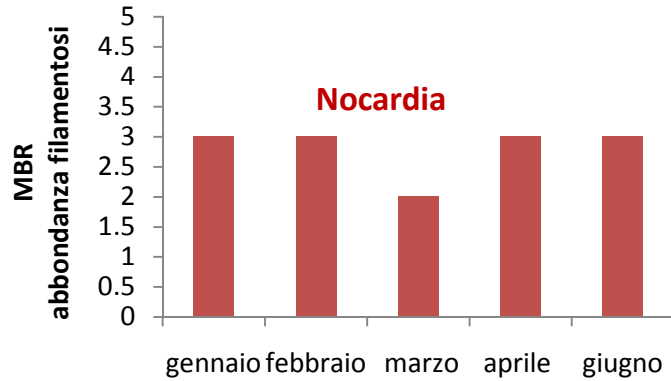
- In accordo con i dati di letteratura si osserva in media una attività di della biomassa più ridotta negli MBR (54,6%) rispetto ai CAS (69,2 %)
- Analogamente si osserva per ogni campionamento un'attività della biomassa dell'MBR inferiore rispetto a quella del corrispondente CAS
- Tuttavia nel campionamento di aprile si osservano nell'MBR di Sorrento livelli di attività maggiori di quelli riscontrati in uno degli impianti convenzionali (CAS di Capri Anacapri)



Abbondanza filamentosi

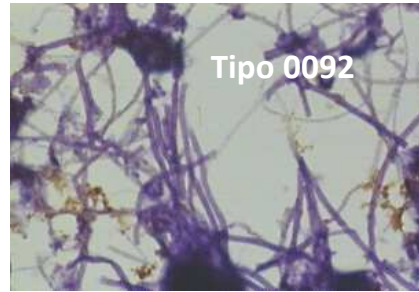
CAPRI-ANACAPRI

Fanghi



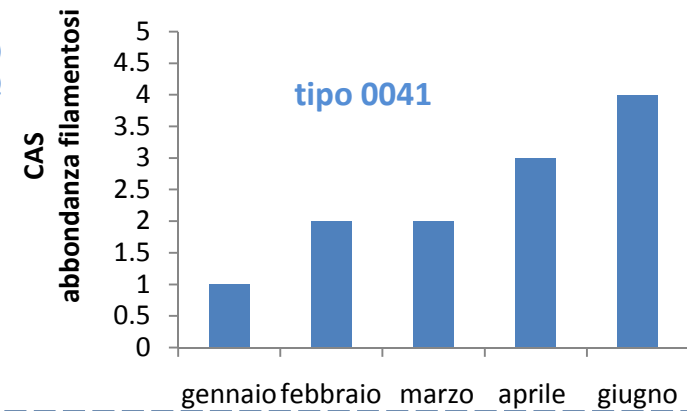
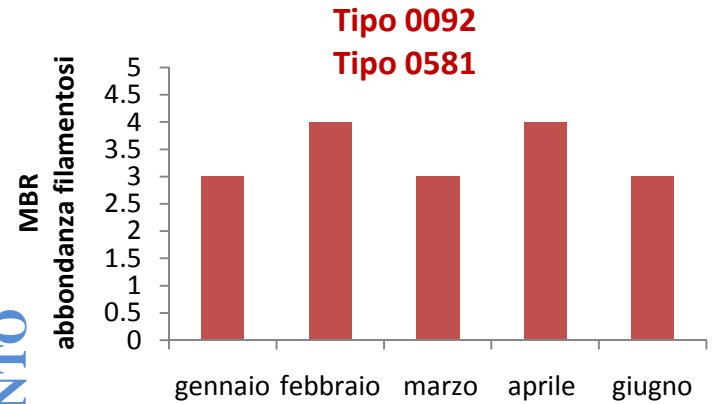
Schiume

- MBR abbondante presenza di nocardioformi (max abb.6)
- CAS nocardioformi (max abb. 4)



SORRENTO

Fanghi



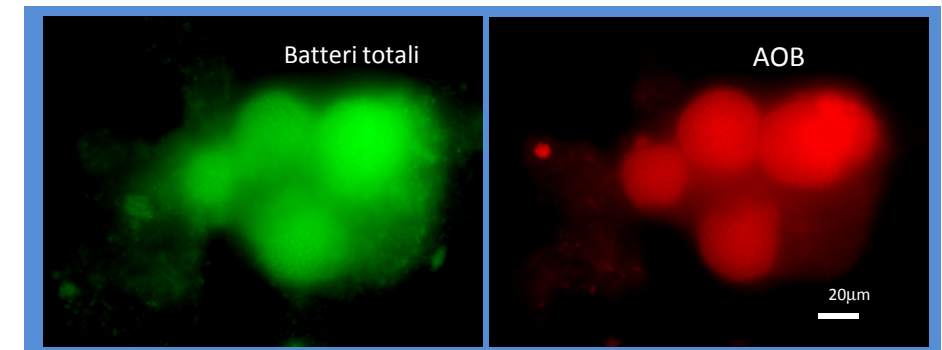
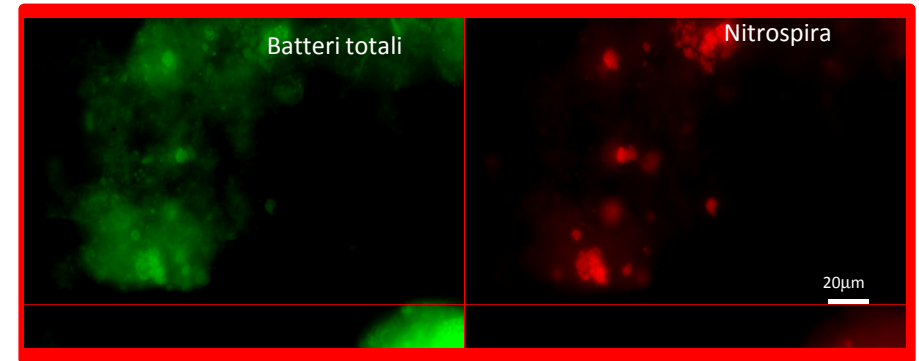
Schiume

- MBR nocardioformi-0092-0581
- CAS tipo 0041 (max abb. 5-6)

- Si osserva una notevole presenza di filamentosi negli impianti MBR
- Non si riscontra uniformità tra gli impianti MBR per il tipo di filamentoso presente
- In accordo con la recente letteratura viene confermata la presenza di schiume (nocardia) nei sistemi MBR

Batteri nitrificanti

MBR CAPRI ANACAPRI	Batteri ammonio- ossidanti (AOB)	Batteri nitrito-ossidanti (NOB)	
		Nitospira	Nitrobact er
Gennaio	2,3 ± 0,5	9,0 ± 1,5	< 0,1
Marzo	2,6 ± 0,1	10,1 ± 1,0	< 0,1
Aprile	1,2 ± 0,4	9,1 ± 1,2	< 0,1
MBR SORRENTO	Batteri ammonio- ossidanti (AOB)	Batteri nitrito-ossidanti (NOB)	
		Nitospira	Nitrobact er
Gennaio	3,3 ± 1,1	7,8 ± 0,3	< 0,1
Marzo	1,8 ± 0,9	10,5 ± 1,6	< 0,1
Aprile	0,2 ± 0,1	11,4 ± 1,8	< 0,1



CAS CAPRI ANACAPRI	Batteri ammonio- ossidanti (AOB)	Batteri nitrito-ossidanti (NOB)	
		Nitospira	Nitrobacter
Gennaio	3,7 ± 0,9	< 0,1	< 0,1
Marzo	7,5 ± 0,4	0,3 ± 0,0	< 0,1
Aprile	0,9 ± 0,1	< 0,1	< 0,1
CAS SORRENTO	Batteri ammonio- ossidanti (AOB)	Batteri nitrito-ossidanti (NOB)	
		Nitospira	Nitrobacter
Gennaio	11,3 ± 0,2	3,2 ± 0,5	< 0,1
Marzo	9,1 ± 0,7	6,3 ± 0,1	< 0,1
Aprile	10,0 ± 0,8	7,3 ± 0,8	< 0,1

- La tecnica FISH ha permesso la quantificazione dei nitrificanti negli impianti CAS ed MBR
- caratteristica degli impianti MBR è una più elevata concentrazione di nitrito ossidanti (nitospira)
- nitrobacter non è stato riscontrato in nessun impianto

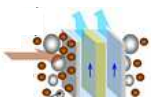
Conclusioni

In relazione all'organizzazione strutturale delle comunità microbiche nei due sistemi è generalmente riportato che fiocchi di più piccole dimensioni sono formati negli impianti MBR rispetto agli impianti non a membrane, tale affermazione però non è sempre confermata in letteratura.

Si notano batteri filamentosi in abbondanza maggiore negli impianti MBR seppure a livello non superiore a 4

In generale si osserva una composizione simile delle schiume, dovute alla presenza di Nocardioformi, soprattutto nel periodo primavera-inverno.

Malgrado gli impianti siano soggetti a variazioni stagionali, si mantiene una sostanziale uniformità nel tempo del tipo di batteri dominanti in ognuno degli impianti studiati.





Dr. Valter Tandoi

Dr.ssa C. Levantesi

Dr.ssa M.L. Luprano

Dr.ssa D. D'Andrea

IRSA-CNR

E-mail: tandoi@itsa.cnr.it

