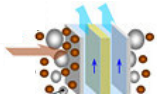



Università degli Studi di Napoli Federico II


Università degli Studi di Palermo


Università degli Studi di Salerno



BioMAc 2016

Composizione microbica e caratteristiche della biomassa dei sistemi MBR: confronti e conseguenze di processo

Dr. V. Tandoi, C. Levantesi, L. Luprano
CNR-IRSA Roma

Palermo, 27-28 ottobre 2016

Sommario

■ **Introduzione**

- Problemi operativi ovunque
- La descrizione del fango attivo mediante microscopia ottica

■ **Dall'approccio tradizionale a quello biomolecolare:**

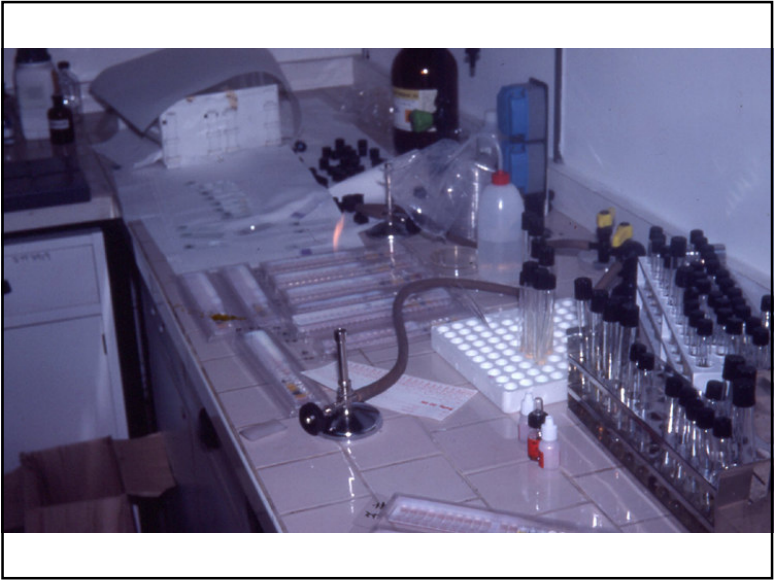
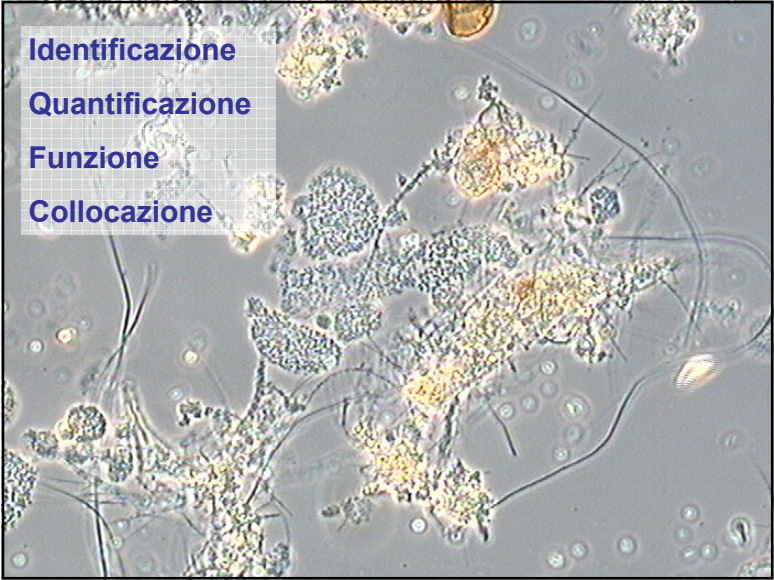
- Isolamento e coltivazione
- Identificazione mediante FISH
- PCR e Sequenziatori di Nuova Generazione (NGS)

■ **Confronti Sistemi MBR e CAS:**

- Tramite metodi Fingerprint
- Tramite NGS

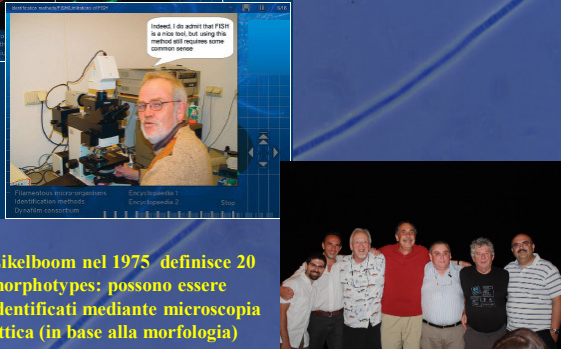
■ **Considerazioni conclusive**


BioMAc 2016

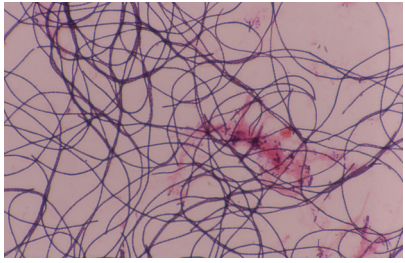


Type 021 N (Dick Eikelboom, 1975)

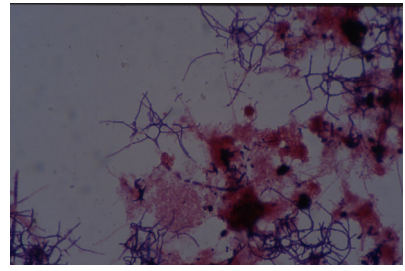
Thiothrix eikelboomii (1999) a gamma-Proteobacterium



Eikelboom nel 1975 definisce 20 morphotypes; possono essere identificati mediante microscopia ottica (in base alla morfologia)

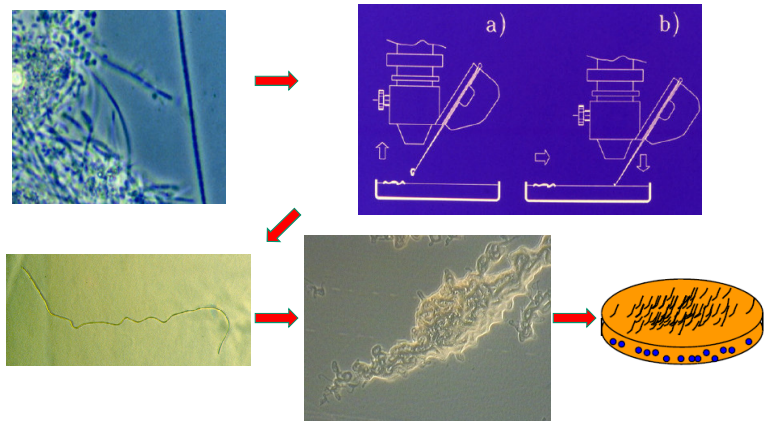


Schiuma biologica da:
Microthrix parvicella



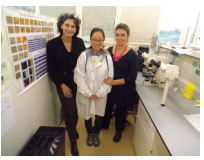
Schiuma biologica da:
Nocardioformi

Isolamento diretto mediante micromanipolazione,

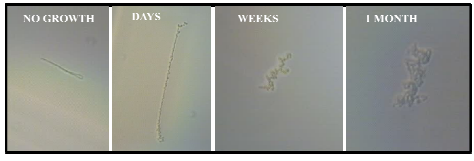
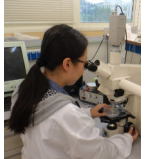


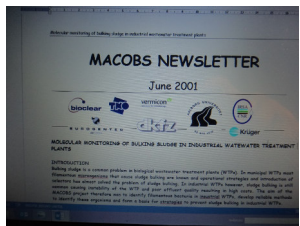
RCEES-CAS visiting PhD student at IRSA-CNR: Niansi Fan

❖ Isolamento di *Microthrix parvicella* da WWPTs Cinesi



Monterotondo
, Novembre
2015





DYNAFILM
Dynamic of filamentous
bacteria in Industrial Systems
(2002-2005)



The UE Project DYNAFILM Team
(Groningen, NL, oct 2002)

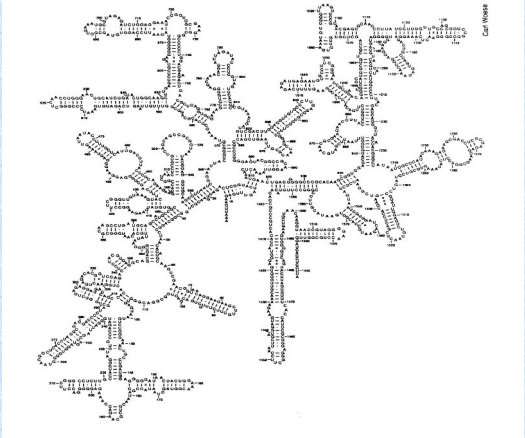


Avvento della Tassonomia molecolare delle sonde biomolecolari

- Consente di ricostruire i rapporti evolutivi fra tutti gli organismi viventi che nel corso del tempo hanno generato, a partire dal comune organismo primigenio, l'enorme varietà del mondo vivente
- Il gene scelto nell'ambito del DNA è quello che codifica l'acido ribonucleico (RNA) contenuto nei ribosomi (RNA ribosomiale)

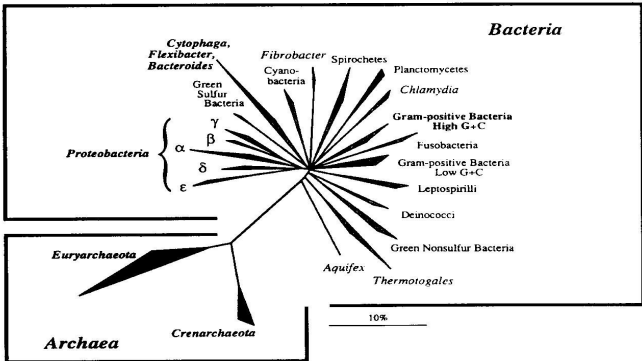


RNA ribosomiale 16 S





Albero filogenetico costruito mediante l'analisi comparativa di circa 1800 sequenze di rRNA 16S che riporta le principali suddivisioni dei domini Bacteria ed Archaea





COSTRUZIONE DI SONDE SPECIFICHE

Eub338

ACUCCUACGGGAGGCAGC

SONDA SPECIFICA PER I BATTERI

CACGGUCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUGGGGAAU

CACGGUCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUUAAGAAU

CACGGACCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAAGGAAU

UACGGCCcAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAGGGAAU

CACGGCCCAACUCCUACGGGAGGCAGCAGUGGGGAAU

CACGGCCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUAGGGAAU

CACGGCCCAGACUCCUACGGGAGGCAGCAGUGGGGAAU

CACGGCCCCAGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

CAACAGUCCAGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

CAAGAUAUCCGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

CACGGGUCCAGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

CAAGGGCCCAGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

CAAGGGCCCAGGCCCACGGGAGGCAGCAGGCGCGAAA

AACGGCUACCAUCCAGGAGGCAGCAGGCGCGCAA

AAUGGCUACCAUCCAGGAGGCAGCAGGCGCGCAA

GACGGCUACCAUCCAGGAGGCAGCAGGCGCGCAA

GACGGCUACCAUCCAGGAGGCAGCAGGCGCGCAA

BACTERIA

ARCHAEA

EUCARYA

FISH

(Fluorescence In Situ Hybridization)

Fasi principali

COMUNITA' MICROBICA

FISSAGGIO

IBRIDAZIONE
sonda oligonucleotidica
marcata
RNA ribosomiale

MICROSCOPIA AD
EPIFLUORESCENZA

Vantaggi

• Specificità

• Analisi *in situ*

• Tempi rapidi di applicazione

• Non necessita della coltivazione

Filamentous Alphaproteobacteria

a

b

c

d

e

f

g

h

i

j

k

l

m

n

o

p

a-b) probe PPx3-1428; c-d) probe MC2-649; e-f) probe Noli-644; g-h) probe Sita-649; i-j) probe Combo-1031; k-l) probe Cate-1013; m-n) probe EU12-645; o-p) probe EU26-653. The scale bar indicates 10 mm.

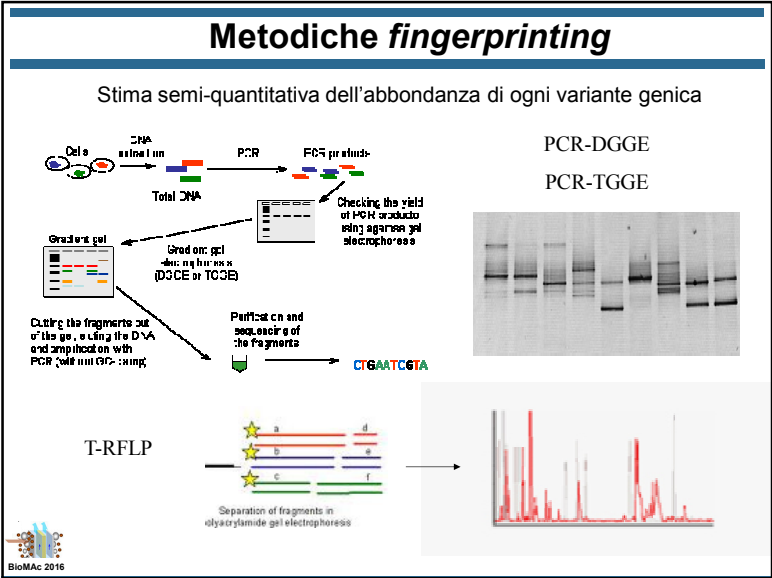
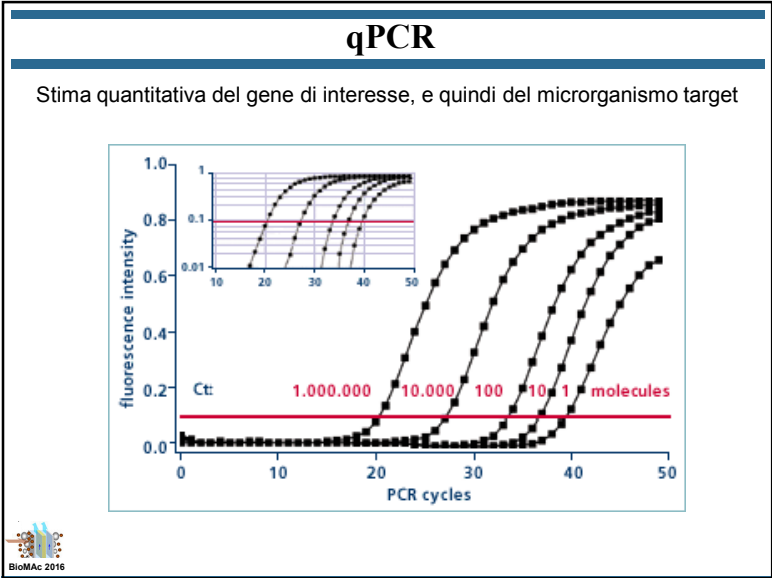
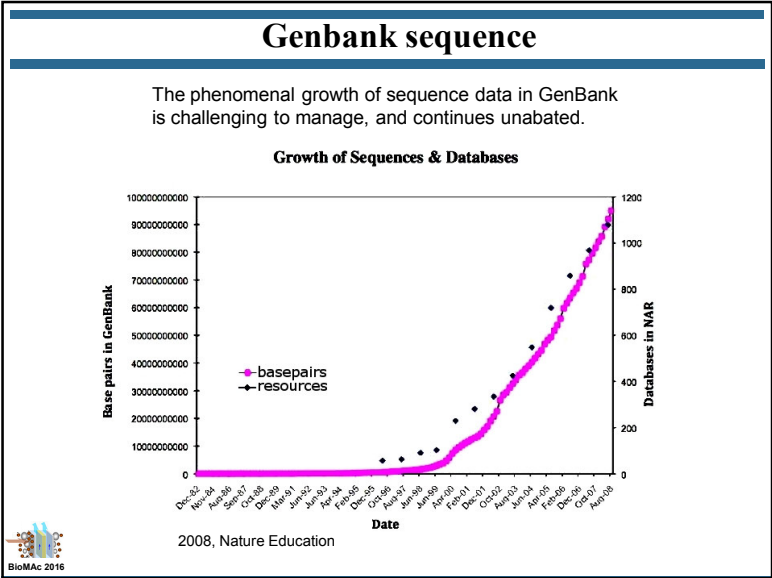
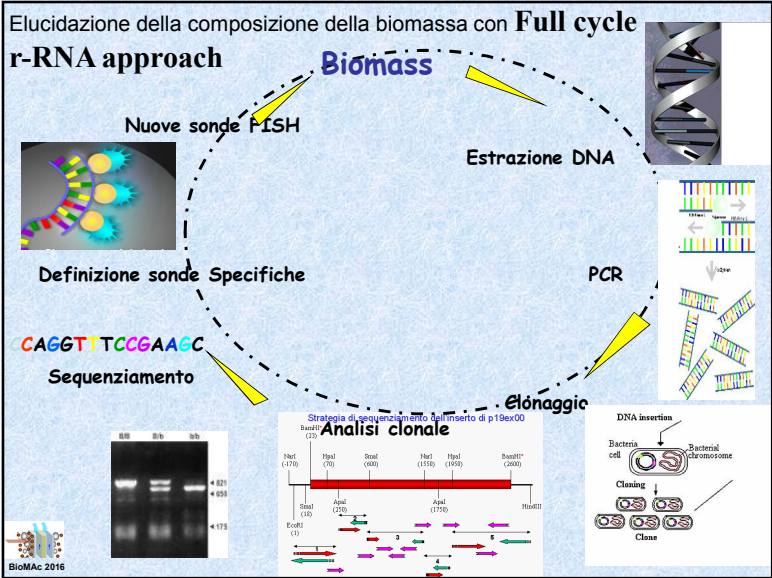
Tabella 1: Principali sonde molecolari attualmente disponibili per alcuni microrganismi importanti nell'ambito dei sistemi di trattamento delle acque di scarico. Sono riportate le sequenze, il sito specifico di attacco delle sonde sull'rRNA e la percentuale di formamide utilizzata nella reazione di ibridazione

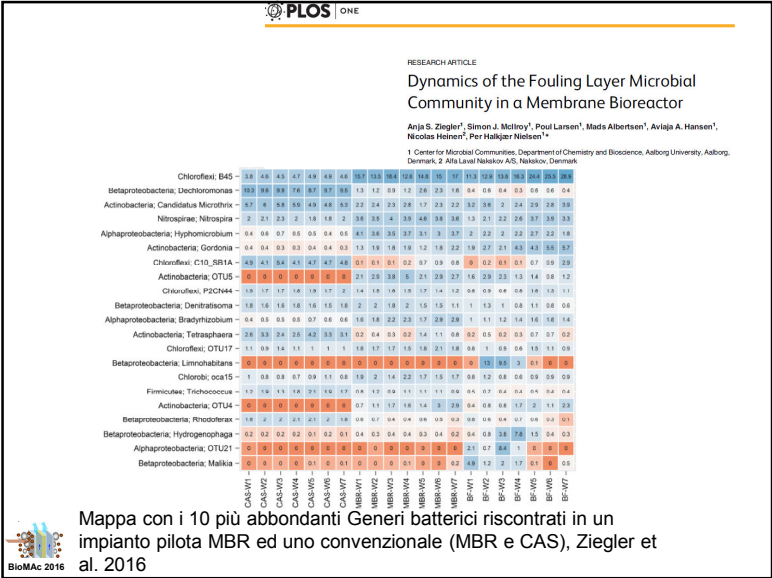
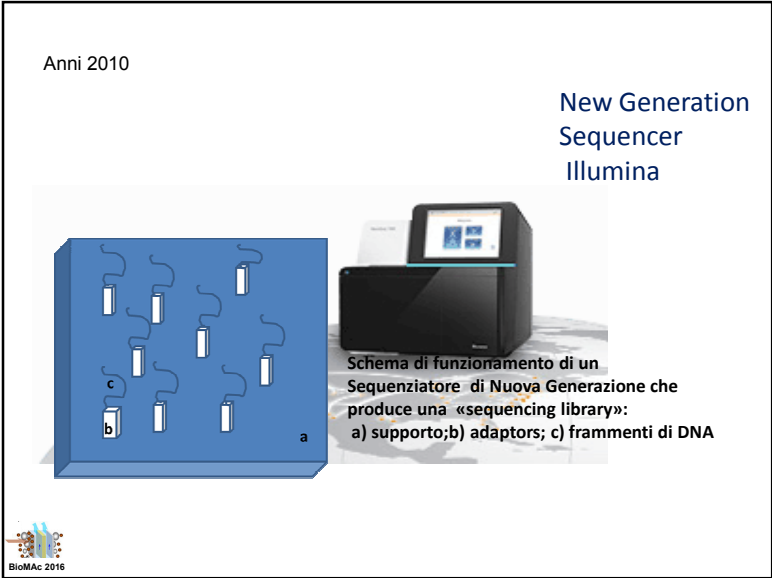
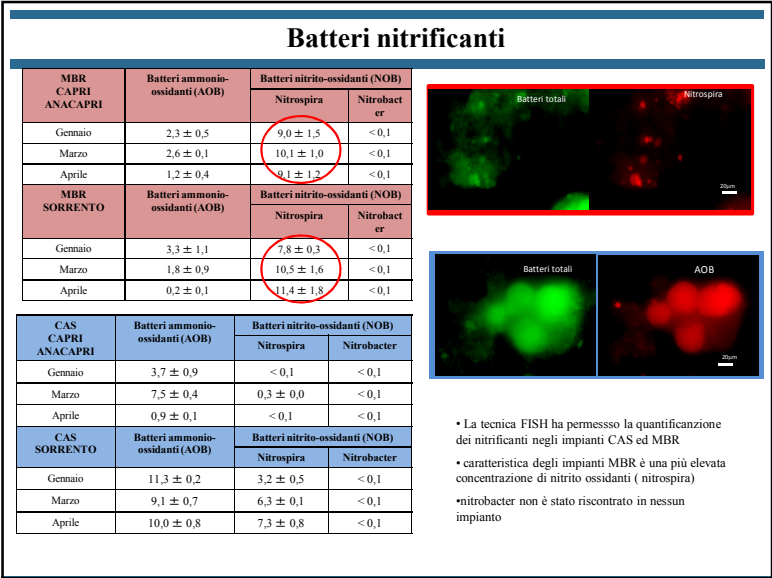
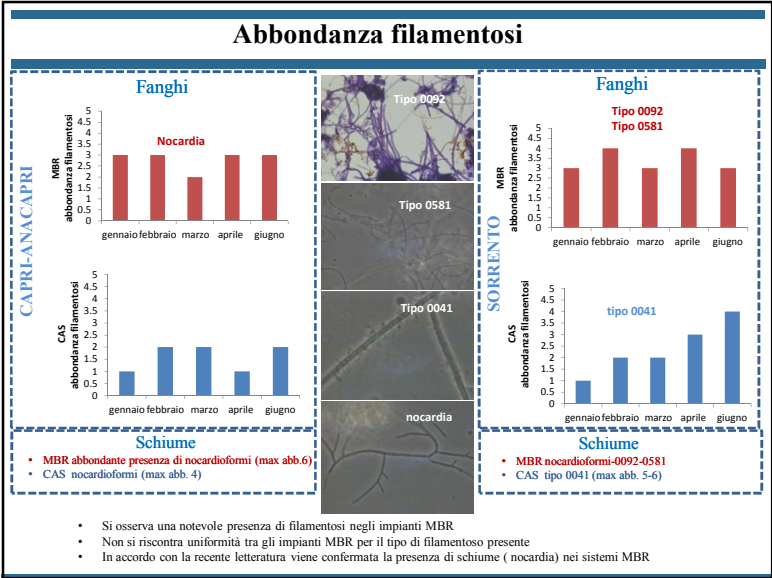
Microorganismo	Sonda	Sequenza della sonda	Bersaglio e posizione *	% formamide	Riferimento
Universale	UNI1392	ACGGGCGGTGTGTRG	16S, 1392-1406	0	Olsen et al., 1986
Eubatteri	EUB338	GCTGCTCCCCAGAGT	16S, 338-355	20	Amann et al., 1990
Archaea	ARC915	GTGCTCCCCCAATTCCT	16S, 915-934	35	Stahl & Amann, 1991
Proteobatteri					
Sottoclasse α	ALF1b	CGTTGGTCTGAGCAG	16S, 19-35	20	Manz et al., 1992
Sottoclasse β	BE142b	GCCTTCCCACTCGTTT	23S, 1027-1043	35	Manz et al., 1992
Sottoclasse γ	GAM42a	GCCTTCCCACTCGTTT	23S, 1027-1043	35	Manz et al., 1992
M. parvicella	MP222	CGCGGAGACCTCCTAG	16S, 223-240	20	Erhart et al., 1997
Thiotrix nivea	TN1	CTCCTCTCCCACTCTA	16S, 652-669	45	Wagner et al., 1994a
M. hydroxila	HHY	CGGTACCTCAGCTGAT	16S, 655-672	20	Wagner et al., 1994a
Type D22N	22IN	TCCCTCTCCCAATCTA	16S, 652-669	35	Wagner et al., 1994a
S. natans	SNA	CATCCCTCTACCGTAC	16S, 656-673	45	Wagner et al., 1994a
Acetobacter sp.	ACA	ATCCTCTCCCACTCTA	16S, 652-669	35	Wagner et al., 1994b
Batteri nitrificanti					
Nitrosomonas, Nitrococcus	NEU123a	CCCTCTGCTGACTCTA	16S, 338-355	40	Wagner et al., 1995
Nitrosomonas, Nitrococcus	Nso1225	CGGATTGTATTACGTGTGA	16S, 1225-1244	35	Mohr et al., 1996
Nitrobacter spp.	NT12	CGGGTTAGCGACCGCT	16S, 1433-1450	40	Wagner et al., 1996
Nitrobacter spp.	NT13	CCGTGCTCCATGCTCGG	16S, 1030-1047	40	Wagner et al., 1996
Batteri denitrificanti					
Pseudomonas spp	Pn	GCTGGCTTACCTTC	23S, 1433-1446	35	Schlotter et al., 1992
Paracoccus spp.	PAR651	ACCTCTCTCGACCTCAG	16S, 651-668	40	Neef et al., 1996
Paracoccus spp.	PAR1244	GGATTAACCCACTGTACCC	16S, 1244-1263	20	Neef et al., 1996
Paracoccus spp.	PAR1457	CTACGCTGGTCCGCTGCC	16S, 1457-1474	35	Neef et al., 1996
Paracoccus denitrificans	Pdv198	CTAATCCTTTGGGATAATC	16S, 198-232	20	Neef et al., 1996
Paracoccus denitrificans	Pdv1031	CCGTGCTCCAGCTACCG	16S, 1031-1048	35	Neef et al., 1996

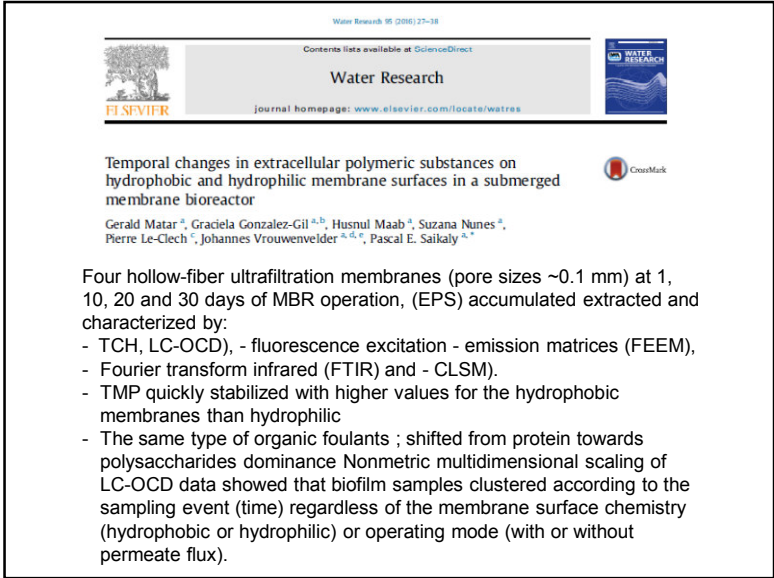
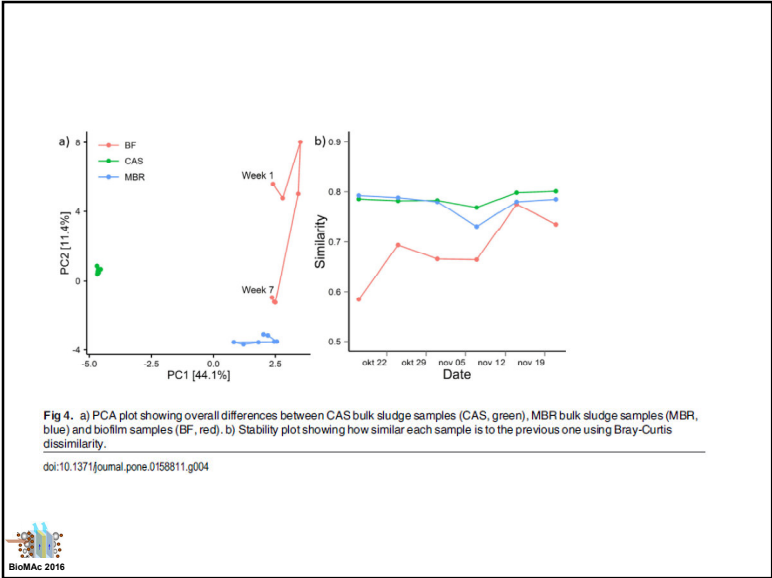
* secondo la numerazione di E. coli in Brosius et al., 1978

Dott. Valter Tandoi

4







- These results suggest that:
- EPS composition may not be the dominant parameter for evaluating membrane performance
- possibly other parameters such as biofilm thickness, porosity, compactness and structure should be considered in future studies for evaluating the development and impact of biofouling on membrane performance.



Conclusioni

- La microscopia tradizionale fornisce in via speditiva informazioni sulla presenza di batteri legati alla formazione di schiume biologiche.
- La tecnica FISH permette di visualizzare e quantificare importanti cluster di batteri rilevanti (Poly-P, Nitrifiers, etc.)
- Complete caratterizzazioni microbiche passano attraverso l'impiego dei moderni Sequenziatori di Nuova Generazione (NGS Illumina). I risultati però devono essere confermati tramite FISH.
- Caratterizzazioni microbiologiche tramite NGS (Ziegler et al 2016) mostrano similarità tra biomassa dei CAS e del MBR nonché del biofilm che si forma. Poco è tuttora noto sui meccanismi di produzione dei biofoulants e sulla loro correlazione con le specie microbiche che li producono





Grazie per la vostra Attenzione!!!!!!

