

ISTRUZIONI

MICROexpert® è un pacchetto software in grado di diagnosticare l'efficienza e le condizioni operative dei processi biologici a fanghi attivi, sulla base dei dati sulle specie microbiche osservate nell'analisi microscopica.

Nel pacchetto vi è "capitalizzata" (con possibilità di continui aggiornamenti) la "conoscenza" relativa alle correlazioni tra la composizione delle biocenosi dei fanghi attivi e le possibili disfunzioni di processo, secondo l'informativa resa disponibile dalle ormai consolidate "scuole di pensiero" di Curds e Cockburn (1970), Madoni (1981), Jenkins (1991) ed altri.

MICROexpert® è in grado di produrre il giudizio di Diagnosi di un esperto biologo, riferito *all'efficienza biologica generale, alle condizioni operative e alla sedimentabilità del fango.*

La funzionalità del programma rispetto all'utente è abbastanza semplice e si esprime attraverso funzioni di imputazione dati, formulazione di diagnosi, stampa report finale, ecc.

I dati richiesti dal programma sono quelli relativi alla Microfauna (protozoi ciliati, flagellati, amebe, rotiferi, metazoi, etc.), ai Batteri Filamentosi (nocardia, m.parvicella, hydrossis, n. limicola, type 1701, type 021N, etc.) e alla microstruttura del Fiocco (morfologia, diametro, etc.) del fango attivo.

Naturalmente, il livello di dettaglio nella formulazione automatica della diagnosi dipende, nel programma, dal tipo e dalla quantità/qualità delle informazioni (dati) di base, e segue la medesima logica con la quale ragionerebbe un esperto biologo.

Testi di riferimento:

- a) MANUAL ON THE CAUSES AND CONTROL OF ACTIVATED SLUDGE BULKING AND FOAMING" - D.Jenkins, M.G.Richard, G.T.Daigger - Lewis Publishers, Inc. - 1994
- b) "MICROBIOLOGIA E DEPURAZIONE" - I.Fantei, F.Strumia, S.Soprani - ed. Caffaro -1987

DATA INPUT

MICROexpert® utilizza fondamentalmente i dati che si riferiscono alla morfologia e al numero di specie di microrganismi osservati al microscopio (generalmente espresso in numero di specie per ml o in classi di abbondanza) su un campione prestabilito di fango.

MICROexpert® non ha bisogno necessariamente del set completo di dati per ciascuna osservazione microscopica: elabora la diagnosi con un numero (e qualità) di dati che sono quelli necessari e sufficienti ad un esperto (umano).

In particolare vengono considerati per la diagnostica i dati relativi a:

- densità della microfauna (totale ciliati e flagellati);
- specie dei protozoi osservate;
- specie batteri filamentosi osservati;
- morfologia del fiocco del fango attivo;
- parametri chimico-fisici specifici e osservazioni visive.

Gli attrezzi di lavoro

Per lavorare proficuamente con MICROexpert® sono necessarie alcune attrezzature fondamentali (v. Attrezzature per l'Identificazione, riportati di seguito):

- * Microscopio Ottico corredato di obiettivi 10x, 40x e 100x, micrometro oculare, micrometro obiettivo, corredo per osservazione in contrasto di fase, Camera di Fuchs-Rosenthal, Materiale per colorazioni (Gram, Neisser, Inchiostro d'India, ecc), vetrini, olio di paraffina, materiale di consumo.
- * Materiale per il Campionamento del Fango Attivo (bottiglie in plastica, aeratore, agitatore magnetico, pipette Pasteur, ecc.);
- * Stazione di lavoro costituito da un personal computer IBM compatibile sul quale è installato MICROexpert®, e una stampante ad aghi o laser.

La diagnosi tempestiva

L'elevata flessibilità ed efficienza che caratterizzano il processo a fanghi attivi nella depurazione delle acque reflue, devono essere salvaguardate da un corretto controllo delle caratteristiche biologiche e microstrutturali del fango. Condizioni operative del fango non appropriate, non tempestivamente diagnosticate e corrette (es.: carenza di ossigeno, carico organico elevato, ecc.), si ripercuotono inevitabilmente, sulla qualità dell'effluente dell'impianto!

La peculiare dinamica "lenta" del processo, generalmente fa sì che eventuali disfunzioni si manifestino dopo un certo lasso di tempo (prezioso per la diagnosi): parimenti, un periodo di tempo sensibilmente lungo (anche di alcune settimane) risulta necessario per riparare i danni di un mancato intervento!

Con l'utilizzo dell'approccio di trouble-shooting microbiologico di MICROexpert® è possibile ottenere una diagnosi tempestiva e spesso predittiva delle disfunzioni di processo.

TECNICHE DI OSSERVAZIONE MICROSCOPICA

CAMPIONAMENTO E TRASPORTO

Il prelievo di un campione ben miscelato di fango attivo (quantità di circa 500ml in una bottiglia di plastica da 1l) è consigliabile venga effettuato nella vasca di aerazione in punti non troppo vicini né alle pareti, né alle turbine e comunque non in zone di ristagno.

Dopo circa 15-20 minuti possono verificarsi profonde alterazioni nella comunità microbica e, più in generale, nella fisiologia del sistema. Se si è avuta la precauzione di lasciare la bottiglia semivuota, l'aria in essa contenuta è sufficiente (entro 3-4 ore) ad evitare che durante il trasporto si verifichino situazioni di anossia del fango.

In particolare, nel caso dell'analisi microscopica delle specie di microfauna, questa deve essere completata possibilmente entro cinque ore dal prelievo per ridurre al minimo alcuni inconvenienti come l'alta mortalità di alcune specie o il forte incremento numerico di altre: nel caso invece, della sola indagine sui batteri filamentosi, il campione può essere utilizzato anche dopo molte ore (es.: 48).

In caso di percorsi lunghi è consigliabile, durante il trasporto, mantenere aerato il campione di fango per mezzo di un insufflatore d'aria alimentato da batterie.

Se si è certi di effettuare l'analisi dopo 4 ore o più il campione può essere conservato in frigorifero a 4°C, facendo attenzione a non far scendere ulteriormente la temperatura per non insorgere nell'alterazione delle caratteristiche dei fiocchi e dei microrganismi.

I campioni prelevati in impianti a basso carico organico si conservano più a lungo (7-10 gg) di quelli provenienti da impianti ad alto carico (3-4 gg)

FREQUENZA DELL'ESAME

La frequenza con cui viene eseguita l'analisi microscopica è funzione della stabilità delle condizioni del processo biologico dell'impianto.

L'esame giornaliero è necessario quando:

- l'impianto è in "bulking"
- si sta additivando cloro per il controllo del "bulking"
- c'è presenza di particolari microrganismi (es. Nocardia)

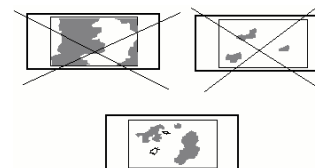
Generalmente, per caratterizzare il fango attivo e annotare "la storia" dell'impianto, è sufficiente analizzare il fango 1 o 2 volte per setti

OSSERVAZIONE PRELIMINARE

[su campione fresco con il contrasto di fase]

1) Con una pipetta Pasteur si preleva una piccola quantità di mixed liquor dalla bottiglia da campionamento in cui il campione è mantenuto in aerazione costante;

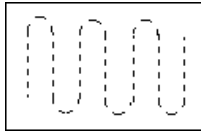
2) Si appoggia una goccia di mixed liquor (es. 50 μ l) sul vetrino portaoggetto, si copre con il vetrino coprioggetto con cautela, in modo che non vengano incluse bolle d'aria fra i due vetrini; premere delicatamente una carta assorbente sul coprioggetti per togliere il materiale in eccesso in modo da evitare che la lente dell'obiettivo si bagni. E' necessario che il preparato non risulti né troppo scarso, né troppo denso, infatti nel primo caso i fiocchi apparirebbero dispersi e la scarsità del liquido provocherebbe un rapido essiccamento del preparato, nel secondo caso il materiale apparirebbe addensato il masse sovrapposte e non permetterebbe l'osservazione dei microrganismi.



Una volta posta sul vetrino la quantità più idonea a ottenere un preparato uniforme, si fa scorrere il vetrino lungo strisce verticali partendo da un'estremità e arrivando all'altra.

N.B.: si deve tenere presente che, poiché al microscopio l'immagine appare rovesciata, l'angolo in basso a destra del vetrino diventa, nell'immagine al microscopio, l'angolo in alto a sinistra.

Per evitare di tornare più volte sullo stesso campo o di tralasciare delle zone del vetrino, si usa generalmente scorrere il vetrino nel modo illustrato in figura:



3) Osservazione a 100x: il preparato fresco viene esaminato in contrasto di fase utilizzando un piccolo ingrandimento (100x) per rendersi conto della struttura dei fiocchi (aggregati di batteri flocculanti e dispersi, con la presenza o meno di filamentosi), dei popolamenti di microrganismi (protozoi, metazoi, ecc.). In particolare, vengono valutate le seguenti caratteristiche:

- la forma e il diametro max dei fiocchi (piccolo <math><100\mu\text{m}</math> - medio 100-200 $\mu\text{m}</math> - grande >100 $\mu\text{m}</math>);$$
- la presenza di batteri filamentosi, la loro abbondanza e l'effetto prodotto sulla struttura dei fiocchi;
- la presenza di colonie di zooglee (particolari batteri flocculanti)
- la presenza e la determinazione (numero) di protozoi, rotiferi e nematodi;
- la presenza di particelle inorganiche od organiche non-biologiche.

OSSERVAZIONE DELLA MICROFAUNA

(Protozoi) 400x [200x]

Il preparato fresco viene esaminato in contrasto di fase utilizzando 400x per quantificare la microfauna secondo le seguenti caratteristiche:

- numero totale di specie che costituiscono la microfauna (esclusi i piccoli flagellati);
- i gruppi funzionali presenti (protozoi ciliati sessili, mobili di fondo, natanti) e la stima della densità;
- la presenza delle specie sessili Vorticella microstoma e Opercularia spp.;
- la presenza e densità di amebe con teca, rotiferi e nematodi, suttori, grandi flagellati;
- la stima dei piccoli flagellati (contati [200x] sulla diagonale della camera di Fuchs-Rosenthal);

Nel caso si desiderino informazioni di maggiore dettaglio, richiedere una copia del 'Atlante dei microrganismi presenti nei fanghi attivi' alla Società ANOVA.

CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DEI PROTOZOI INDICATORI

(V. Allegato A4)

PROCEDURE DI STIMA/CONTEGGIO DELLE ABBONDANZE RELATIVE

Per una stima accurata della microfauna del fango attivo, essendo elevata la sua densità di popolazione in questo ambiente, è sufficiente effettuare analisi su un volume di 25 μl , replicati da 2 a 4 volte.

La procedura è la seguente:

- si prelevano 25µl di fango mediante una micropipetta automatica a volume variabile (da 0 a 50µl) e, dopo aver posto il campione su di un vetrino, si copre con coprioggetto di 18x18mm;

- si pone il vetrino al microscopio e a 100x lo si analizza interamente, procedendo per fasce, contando e segnando su di un foglio i protozoi ciliati (precedentemente identificati) che si presentano via, via all'osservazione.

Attenzione va rivolta affinché non venga esclusa dall'osservazione l'eventuale frazione di mixed-liquor che fuoriesce dal vetrino coprioggetto.

- Si effettuano le repliche di conteggio programmate.

Ad analisi ultimata i dati ottenuti per ciascuna specie o gruppo vengono espressi sia in [n.ind./ml] che in [n.ind./l] di fango attivo. Può succedere che di alcune specie osservate nel vetrino preliminare, nessun individuo sia rinvenuto durante il conteggio: in questo caso bisognerà considerare sia la presenza della specie che la sua scarsa densità di popolazione. Una soluzione è quella di assegnare alla specie un valore convenzionale di densità numerica pari a 1 [ind./ml] di fango (1000 ind./l).

Un esempio di conteggio è il seguente:

SPECIE	1	2	1+2	N./ml	N./l (x 10 ³)
Trachelophyllum pusillum	23	19	42	840	840
Aspidisca cicada	118	130	248	4960	4960
Vorticella convallaria	65	57	122	2440	2440
Opercularia coarctata	-	2	2	40	40
Podophryra	-	-	-	1	1
TOTALE CILIATI	206	208	414	8280	8280
Rotiferi	1	-	1	20	20

- La stima di abbondanza dei piccoli flagellati richiede una tecnica di conteggio appropriata sia per la loro ridotta dimensione, sia per la loro alta densità che spesso raggiunge 10-100 milioni ind./l.

A questo scopo la camera di Fuchs-Rosenthal da 3.2µl si dimostra particolarmente adatta.

La camera ha le dimensioni di 4x4x0.2 mm ed è suddivisa in 256 quadrati di 250µm di lato.

Devono essere contati i flagellati che si trovano all'interno dei 16 quadrati che formano una delle due diagonali della camera. Quando i flagellati contati lungo la diagonale sono meno di 10, la loro densità nel fango è modesta (<50.000/ml); quando il loro numero sulla diagonale è superiore a 100, essi devono essere considerati come gruppo dominante (densità di 500 mil. ind./l).

Il conteggio dei flagellati deve essere eseguito a 200x.

OSSERVAZIONE DEI BATTERI FILAMENTOSI

[1000x]

PROCEDURE DI IDENTIFICAZIONE DELLE SPECIE E STIMA DELLE CLASSI DI ABBONDANZA

Il riconoscimento dei batteri filamentosi viene effettuato principalmente secondo le seguenti tecniche:

1) su preparato fresco a 1000x in contrasto di fase (v. osserv. preliminari): si procede alla stima delle classi di abbondanza tenendo conto del seguente schema:

CLASSI DI ABBONDANZA BATTERI FILAMENTOSI (secondo Jenkins) (*)

0 [nessuno]:	assenza totale di batteri filamentosi
1 [pochi]:	batteri filamentosi osservati solo in qualche fiocco
2 [alcuni]:	batteri filamentosi osservati in circa la metà dei fiocchi
3 [moderati]:	batteri filamentosi osservati in tutti i fiocchi, ma con bassa densità (1-5 filamenti/fiocco)
4 [frequenti]:	batteri filamentosi osservati in tutti i fiocchi, ma con media densità (5-20 filamenti/fiocco)
5 [abbondanti]:	batteri filamentosi osservati in tutti i fiocchi, ma con media densità (5-20 filamenti/fiocco)
6 [eccessivi]:	batteri filamentosi dominanti; si trovano, abbondanti, anche liberi in soluzione

(*) V. Allegato A2

CARATTERISTICHE MORFOLOGICHE DEI BATTERI FILAMENTOSI

(V. Allegato A3)

2) su preparato essiccato (a temperatura ambiente) e sottoposto a colorazione (es.: Gram, Neisser): si distribuisce sul vetrino portoggetti il mixed-liquor per un'area approssimativamente del 50% del vetrino stesso e lo si lascia asciugare lentamente in aria e a temperatura ambiente (non asciugare con fonti di calore più drastiche!).

I coloranti utilizzati sono di due tipi:

- negativi, che aumentano il contrasto aumentando l'opacità di fondo (inchiostro d'India);

- positivi, che combinandosi chimicamente con la cellula nei siti dove sono presenti le opportune condizioni biochimiche, permettono di ottenere informazioni circa la natura e la localizzazione delle strutture cellulari.

La capacità di un colorante a combinarsi o meno con una struttura cellulare, permette di ottenere informazioni circa il possesso di particolari strutture o di strutture intracellulari, facilitando il riconoscimento dei microrganismi. E' naturale che le colorazioni sono effettuate al fine dell'identificazione di un microrganismo o un gruppo di essi chiaramente distinguibili al di fuori del fiocco.

Nell'allegato A1 si riportano le metodiche delle tecniche di colorazione.

PARAMETRI DI VALUTAZIONE E CONTROLLO

PARAMETRI CHIMICO-FISICI

Oltre all'esame microscopico del fango attivo, MICROexpert® può utilizzare alcuni dati/parametri chimico-fisici di valutazione e controllo, finalizzati all'indagine diagnostica. Viene qui di seguito riportata la lista dei dati previsti dal programma.

Con riferimento all'influente:

- OUR (Oxygen Uptake Rate) espresso come [mgO₂/gSSV/h];
- ORP (Oxygen Potential Redution) espresso come [mV];
- CODsolubile (secondo Pitman) espresso come [mg/l];

Con riferimento al reattore biologico:

- Carico Organico F/M espresso come [KgCOD/Kg MLVSSxd] (proc. aerobici);
- Ossigeno Disciolto DO espresso come [mg/l] (per processi aerobici);
- N-NO₂ (azoto nitrico, per processi con rimozione di nutrienti);
- pH;
- Indice del Volume del Fango SVI;
- Tempo di Residenza Idraulico del sedimentatore secondario [h];
- Presenza o meno di barriere alle schiume nel sistema;

Con riferimento all'effluente:

- Concentrazione dei solidi sospesi totali (SST);
- N-NH₄ (azoto ammoniacale);
- N-NO₃ (azoto nitroso);
- P-PO₄ orto (fosforo solubile).

Il sistema richiede normalmente le informazioni dell'indagine microscopica, ma soprattutto quando l'analisi microscopica non individua problemi legati alla proliferazione eccessiva di batteri filamentosi, è opportuno valutare anche la lista di parametri chimico-fisici.

Va ricordato infine, che MICROexpert® emula il ragionamento dell'esperto chimico-biologo durante la fase di diagnosi dei problemi di separazione dei solidi per cui, se ha a disposizione dati insufficienti, la sua diagnosi avrà una certezza di basso livello.

APPENDICE

A. Attrezzatura per l'identificazione

Viene qui di seguito riportato il corredo di attrezzature necessario per poter sviluppare correttamente l'indagine microscopica sui microrganismi indicatori che popolano il fango attivo:

1) Microscopio ottico dotato di sistema ottico in campo chiaro e in contrasto di fase con ingrandimenti 100x, 200x (non indispensabile), 400x, e 1000x, completo di micrometro oculare e micrometro obiettivo.

L'utilizzo del microscopio ottico con **sistema a contrasto di fase** consente di esaltare il potere di risoluzione e di evidenziare quelle strutture delicate e trasparenti che presentano un indice di rifrazione poco diverso dal mezzo in cui sono immerse (pareti cellulari, granuli citoplasmatici, guaine, etc.).

I particolari della cellula sono visibili solo se si possono determinare sufficienti variazioni dell'ampiezza, e quindi dell'intensità luminosa, dell'onda che li colpisce rispetto al mezzo in cui sono immersi.

Per ottenere questo risultato si utilizza uno speciale condensatore; esso seleziona un anello di raggi luminosi che va a colpire con perfetta sovrapposizione, dopo aver attraversato il preparato, un anello fotoinciso sull'obiettivo costituito da uno speciale materiale trasparente detto lamina di fase.

Le piccole variazioni di intensità subite dalle radiazioni luminose mentre attraversano i vari organuli del preparato vengono esaltate in seguito all'interferenza della lamina di fase.

La sostanza contenuta in essa provoca, infatti, un ulteriore sfasamento dei raggi luminosi in arrivo dalle varie strutture cellulari; si ottiene così un potenziamento delle variazioni che l'intensità luminosa aveva subito in precedenza per l'interposizione del preparato, permettendo una visione ben definita degli organuli.

L'osservazione in **campo chiaro** è invece utilizzata per evidenziare l'affinità di alcuni organismi o parti di essi per determinate sostanze coloranti, e quindi

aggiungere un ulteriore elemento diagnostico per il riconoscimento degli organismi in esame.

Per una migliore osservazione è opportuno dotare l'apparecchiatura di doppio oculare e, preferibilmente, di accessorio per fotografie, che sono di estrema utilità per avere memorandum degli episodi salienti e significativi (case-history).

2) Bottiglie da campionamento in plastica da 1l

3) Aeratore (ad es.: tipo per acquari) alimentato da batterie, se non si lavora nella sede dell'impianto.

4) Vetrini portaoggetti 26x76 mm

5) Vetrini coprioggetto:

- per analisi microfauna: 18x18 mm - 24x32 mm

- per analisi filamentosi: 24x50 mm - 24x60 mm - 24x32 mm

6) Camera di Fuchs Rosenthal (Ranvier) e relativi copricamera (per cont. piccoli flagellati): essa consiste di una cella di conteggio quadrangolare profonda 0.2 mm portante un reticolo di 16x16 quadrati. L'intera cella è un quadrato di 4 mm di lato suddiviso (mediante triplici solchi) in 16 quadrati di 1 mm di lato che, a loro volta, sono ulteriormente suddivisi in 16 quadratini di 250µl.

Devono essere contati i flagellati all'interno dei 16 quadrati che formano una delle diagonali della camera.

7) Micropipetta (Pasteur) automatica a volume variabile 0-50µl

8) Soluzione al 10% di metilcellulosa (mezzo viscoso per rallentare il movimento di alcuni microrganismi come ad es.: ciliati natanti)

9) Alcool etilico

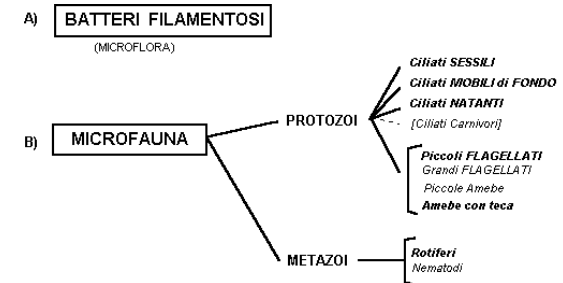
10) Soluzione verde metile [0.1 gr. in 100 ml di acido acetico all'1%] (per mettere in evidenza strutture come la ciliatura, l'apparato boccale ed i nuclei)

11) Reagenti per le colorazioni di Gram - Neisser e per i Test

- acqua distillata
- acido acetico
- alcol etilico
- ammonio ossalato
- blu di metilene
- brown Bismark
- cristal violetto
- inchiostro di China
- iodio
- metilcellulosa
- potassio ioduro
- safranina
- sodio solfuro
- sodio tiosolfato.

B. Ordinamento dei Microrganismi Indicatori

CLASSIFICAZIONE TROFICA DEI MICRORGANISMI INDICATORI



BATTERI FILAMENTOSI:

- Nocardia sp.
- Microthrix parvicella
- Sphaerotilus natans
- Thiothrix spp.
- Type 1701
- Type 021N
- Type 0041
- Haliscomenobacter hydrossis
- Fungus
- Type 0092
- Nostocoida limicola
- Type 0803
- Type 1851
- Type 0961
- Type 0675
- Beggiatoa
- Type 0581
- Type 0914
- Flexibacter spp.

MICROFAUNA (Protozoi- Metazoi):

I Protozoi e altre forme di vita superiore costituiscono approssimativamente il 5% della biomassa del fango attivo e sono rappresentati da circa 200 specie (Curds, 1973; Curds, 1975)

PROTOZOI CILIATI (Batteriofagi):		
	SESSILI (Pedunculati):	
		Vorticella microstoma Vorticella convallaria Vorticella octava Vorticella campanula Zoothamnium spp. Opercularia microdiscum Opercularia coarctata Epistylis spp. Vaginicola crystallina Carchesium spp. Stentor spp.
	MOBILI di FONDO:	
		Aspidisca lynceus Aspidisca cicada Stylonychia spp. Chilodonella uncinata Trochilia minuta Euplotes affinis Euplotes moebiusi Euplotes patella
	NATANTI:	
		Colpoda sp. Colpidium colpoda Colpidium campylum Uronema nigricans Paramecium spp. Cinetochilum margaritaceum Tetrahymena pyriformis Glaucoma scintillans Cyclidium glaucoma Sathrophilus sp. Dexiotricha sp. Loxocephalus sp. Spirostomum teres Pseudocohnilambus pusillus Trachelophyllum pusillum (*) Acineria uncinata (*) Drepanomonas revoluta (*) (*) Forme natanti che svolgono la loro attività predatoria nei pressi del fiocco
	Carnivori:	(contribuiscono solamente alla densità e diversità totale della microfauna)

		> Olotrici (natanti): Acineria incurvata Amphileptus sp. Coleps hirtus Litonotus spp Spathidium spp.
		> Suttori (Sessili): Acineta spp. Metacineta sp. Podophrya spp. Tokophrya spp.
	Piccoli FLAGELLATI:	
		Bodo Polytoma Tetramitus
	Grandi FLAGELLATI:	
		Euglena Paranema
	AMEBE con Teca:	(presenti quando con una buona nitrificazione)
		Arcella Euglypha Diffugia
	Piccole AMEBE	
METAZOI		
	ROTIFERI (Piccoli Metazoi)	
	NEMATODI (Piccoli Metazoi)	

C. Chiavi di Identificazione

Vengono qui di seguito riportati a titolo esemplificativo, alcuni dei criteri di indagine per la identificazione dei batteri filamentosi e della microfauna in generale.

	CHIAVE di Indagine	Caratteristiche dei Batteri FILAMENTOSI
1	PRESENZA DI RAMIFICAZIONI	<u>Vere</u> : Nocardia spp., Fungi, Nostocoida limicola <u>False</u> : Sphaerotilus natans
2	MOTILITA'	Beggiatoa spp., Flexibacter spp., Thiothrix spp, Type 021N
3	DIMENSIONI E FORMA DEI TRICOMI	<u>Presenza di guaina</u> : S.natans, Type 1701, Type 0041, Thiothrix, Beggiatoa, Type 1851, Type 0092, H.hydrissis <u>Filamento grande leggermente curvato</u> : 021N <u>Disposizione a fasci</u> : Type 1851
4	DIMENSIONI E FORMA DELLE CELLULE	<u>A botticella</u> : Type 021N <u>Arrotondate</u> : S.natans, Type 1701 <u>Quadrate</u> : Type 0041, Thiothrix I <u>Discoideali</u> : Nostocoida limicola <u>Indistinguibili</u> : Nocardia, Microthrix parvicella, H.hydrissis, Beggiatoa, Type 1851, Type 0092)
5	PRESENZA E ASPETTO DEI SETTI INTERCELLULARI	
6	PRESENZA DI BATTERI EPIFITICI (Crescita attaccata)	Type 0041, Type 0675, Type 1701, Type 1851
7	PRESENZA DI GRANULI INTRACELLULARI (Zolfo, PHB)	<u>Zolfo</u> : Thiothrix spp., Beggiatoa spp., Type 021N, Type 0914)
8	AFFINITA' PER DETERMINATI COLORANTI (Gram, Neisser)	<u>Gram +</u> : Nocardia, Microthrix parvicella, Nostocoida limicola, Type 0041, Type 0675 <u>Gram -</u> : Thiothrix I, Beggiatoa, Type 021N, Type 0914 <u>Neisser +</u> : Type 0092, Nostocoida limicola <u>Neisser -</u> : Nocardia, Microthrix parvicella, Thiothrix spp., Beggiatoa, Type 0041, Type 0675, Type 021N, Type 0914, Type 1863

	CHIAVE di Indagine	MICROFAUNA
1	MOTILITA'	Flagellati, Amebe, Ciliati Natanti (<i>molto veloci</i>), Ciliati Sessili (<i>ancorati al fiocco</i>), Rotiferi e pochi altri invertebrati
2	FORMA DEL CORPO	A campana
3	DIMENSIONI	---
4	CILIATURA	---
5	APPARATO BOCCALE	---
6	NUCLEI	---

Infine, vengono riportate le principali associazioni microrganismi-disfunzioni (causa-effetto) riscontrate negli impianti di depurazione e che costituiscono la base delle metodologie di trouble-shooting utilizzate in MICROexpert®.

ASSOCIAZIONE MICRORGANISMI - DISFUNZIONI DI PROCESSO

	DISFUNZIONI di Processo	Batteri FILAMENTOSI	MICROFAUNA
1	BULKING FILAMENTOSO	Microthrix parvicella Sphaerotilus natans Thiothrix spp. Type 1701 Type 021N Type 0041 Haliscomenobacter hydrissis Fungus Type 0092 Nostocoida limicola Type 0803 Type 1851 Type 0961 Type 0675 Beggiatoa Type 0581 Type 0914	---
2	FOAMING	Nocardia sp. Microthrix parvicella	---
3	BASSO CARICO DEL FANGO F/M	Nocardia sp. Microthrix parvicella Haliscomenobacter hydrissis Type 021N Type 0092 Type 0803 Type 0041 Type 0675 Type 0961 Type 0581	Protozoi Ciliati Sessili (es.: <i>Epistylis spp.</i> , <i>Vaginicola crystallina</i>) Euplotes patella (mobili di f.) Trochilia minuta (mobili di f.) Litonotus spp Rotiferi Nematodi Suttori Amebe con teca (<i>Arcella</i> , <i>Euglypha</i> , <i>Diffugia</i>) Grandi Flagellati (<i>Euglena</i> , <i>Paranema</i>)
4	BASSO OSSIGENO DISCIOLTO	Sphaerotilus natans Haliscomenobacter hydrissis Type 021N Type 1701	Protozoi Ciliati Natanti (es.: <i>Colpidium colpoda</i> , <i>Tetrahymena pyriformis</i> , <i>Uronema nigricans</i> , <i>Cyclidium glaucoma</i> , <i>Glaucoma scintillans</i>) Piccoli Flagellati Vorticella microstoma (<i>sessili</i>) Opercularia microdiscum (<i>sessili</i>) Opercularia Coarctata (<i>sessili</i>)
5	ALTO CARICO DEL FANGO F/M	---	Protozoi Ciliati Natanti (es.: <i>Colpidium colpoda</i> , <i>Tetrahymena pyriformis</i> , <i>Cyclidium glaucoma</i> , <i>Sathrophilus sp.</i> , <i>Glaucoma scintillans</i> , <i>Uronema nigricans</i> ,

			<i>Paramecium spp.</i> , <i>Coleps hirtus</i>) Vorticella microstoma (<i>sessili</i>) Piccoli Flagellati
6	ELEVATO CONTENUTO DI SOLFURI/SOSTANZE FERMENTATE	Thiothrix spp. Beggiatoa Type 021N Type 0914	Piccoli Flagellati
7	DEFICIENZA DI NUTRIENTI	Thiothrix spp. Sphaerotilus natans Haliscomenobacter hydrossis Type 021N Type 0041 Type 0675	—
8	BASSO pH	Fungus	—
9	ALTO CODsolubile (nell'Influente)	Thiothrix spp. Sphaerotilus natans Haliscomenobacter hydrossis Nostocoida limicola Type 021N Type 1851	—
10	SCARICHI TOSSICI	—	Opercularia coarctata (<i>sessili</i>) Piccoli Flagellati Colpidium colpoda Uronema nigricans Tetrahymena pyriformis Cyclidium glaucoma
11	BASSO TEMPO DI RITENZIONE	—	Litonotus spp Uronema nigricans Tetrahymena pyriformis Cyclidium glaucoma Sathrophilus sp.
12	FENOMENI TRANSITORI	—	Colpidium colpoda Tetrahymena pyriformis Trachelophyllum pusillum Euplotes affinis Vorticella microstoma Vorticella convallaria Opercularia coarctata Piccoli Flagellati
13	ALTO TEMPO DI RITENZIONE	—	Amebe con teca

ALLEGATI

A1. Le Colorazioni

COLORAZIONE DI GRAM (MODIFICATA DA HUCKER)

[evidenzia la struttura della parete cellulare]

Reagenti (da preparare massimo ogni 3-6 mesi)

Soluzione 1 (preparare separatamente le 2 soluzioni e miscelare successivamente).

Soluzione A		Soluzione B	
Cristal Violetto	2 g.	Ossalato di ammonio	0,8 g.
Etanolo	20 ml	Acqua distillata	80 ml

Soluzione 2

Iodio	1 g.
Ioduro di potassio	2 g.
Acqua distillata	300 ml

Soluzione 3

Acqua distillata	100 ml
Safranina O (2,5% in 95% etanolo)	10 ml

Procedura

1. Asciugare all'aria una goccia di campione su un vetrino portaoggetti.
2. Applicare la soluzione 1 per 1 minuto e risciacquare per 1 secondo con acqua.
3. Applicare la soluzione 2 per 1 minuto e risciacquare bene con acqua.
4. Inclinare il vetrino e decolorare versando goccia a goccia etanolo al 95% per 25 secondi e non oltre; lasciare asciugare.
5. Applicare la soluzione 3 per 1 minuto, risciacquare con acqua e lasciare asciugare all'aria.
6. Esaminare a 1000X con luce diretta obiettivo a immersione.

Risultati

BLU-VIOLETTO: positivo

ROSSO: negativo

COLORAZIONE DI NEISSER

[evidenzia i grani intracellulari di polifosfati che sono importanti non solo come carattere distintivo di molti organismi filamentosi, ma anche per evidenziare ammassi di batteri come i fosforo accumulanti]

Reagenti (da preparare massimo ogni 3-6 mesi)

Soluzione 1 (preparare separatamente le 2 soluzioni e miscelare successivamente) miscelare 2 parti in volume di A e 1 di B.

Soluzione A		Soluzione B	
Blu di metilene	0,1 g.	Cristal violetto	3,3 ml
Etanolo (95%)	5 ml	Etanolo (95%)	6,7 ml
Acido acetico glaciale	5 ml	Acqua distillata	100 ml
Acqua distillata	100 ml		

Soluzione 2

Bruno Bismark (1% peso/volume in acqua)	33,3 ml
Acqua distillata	66,6 ml

Procedura

1. Asciugare all'aria una goccia di campione su un vetrino portaoggetti.
2. Applicare la soluzione 1 per 30 secondi e risciacquare per 1 secondo con acqua.
3. Applicare la soluzione 2 per 1 minuto e risciacquare bene con acqua e lasciare asciugare all'aria.
4. Esaminare a 1000X con luce diretta obiettivo a immersione.

Risultati

BLU-VIOLETTO: positivo

GIALLO-MARRONE: negativo

(può risultare colorata l'intera cellula o solamente i granuli intracellulari)

COLORAZIONE ALL'INCHIOSTRO D'INDIA

[evidenzia all'interno del fiocco parti costituite da ammassi di materiale esocellulare prodotto dai batteri, normalmente indice di un fango attivo in crescita in carenza di azoto e fosforo, che è comune quando nelle acque reflue è presente una considerevole componente industriale]

Reagenti

Inchiostro d'India comune inchiostro per penne stilografiche (sospensione acquosa di particelle di carbone).

Procedura

1. Mescolare una goccia di inchiostro e una goccia di fango attivo su un vetrino; in dipendenza del tipo di inchiostro usato può essere necessario ridurre il volume.
2. Applicare il vetrino coprioggetto ed esaminare a 1000X in contrasto di fase.

Risultati

Se l'inchiostro penetra uniformemente il fiocco, lasciando minuscole zone chiare, si è in presenza di fanghi attivi normali.

Se sono evidenti larghe aree chiare con scarsa densità di cellule, si è in presenza di fanghi attivi contenenti larghi ammassi cellulari.

TEST DI OSSIDAZIONE DEI SOLFURI (S test)

[evidenzia se i batteri filamentosi presenti sono in grado di accumulare granuli di zolfo elementare all'interno della cellula; questo test è basilare per la classificazione di alcuni importanti batteri filamentosi, come Thiotrix, Beggiatoa, Type 021N]

TEST A	
	Reagenti Solfuro di sodio (Na ₂ S 9H ₂ O): 1gr/litro (da preparare settimanalmente)
	Procedura 1. Mescolare una goccia di soluzione di solfuro di sodio e una goccia di fango attivo su un vetrino 2. Attendere circa 15 minuti 3. Applicare il vetrino coprioggetto e premere delicatamente per espellere l'eccesso di soluzione e asciugare 4. Esaminare a 1000X in contrasto di fase (I granuli sono prodotti per ossidazione aerobica dei solfuri fino a zolfo elementare e, in funzione della concentrazione dei reagenti, si possono avere risultati non certi)
TEST B	
	Reagenti Tiosolfato di sodio (Na ₂ S ₂ O ₃ 5H ₂ O): 1gr/100 ml (da preparare settimanalmente)
	Procedura 1. Far sedimentare il campione di fango e prelevare 20 ml di surnatante chiarificato e trasferire in una beuta da 100 ml 2. Aggiungere 1-2 ml di fango attivo nella beuta e 1 ml di tiosolfato 3. Tenere in agitazione per 12 ore a temperatura ambiente 4. Esaminare a 1000X in contrasto di fase

Risultati

POSITIVO: saranno visibili granuli altamente rifrangenti di colore giallo all'interno del citoplasma dei batteri filamentosi.

NEGATIVO: nessun effetto.

COLORAZIONE AL CRISTAL VIOLETTA

[evidenzia la presenza di guaine]

Reagenti

Cristal violetto soluzione acquosa 0,1% peso/volume.

Procedura

1. Mescolare una goccia di soluzione e una goccia di fango attivo su un vetrino.

2. Applicare il vetrino coprioggetto ed esaminare a 1000X in illuminazione diretta.

Risultati

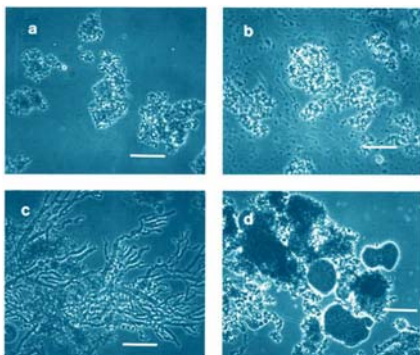
Le celle si colorano di viola.

Le guaine vengono evidenziate da una colorazione rosa.

A2. Caratteristiche Morfologiche del Fiocco

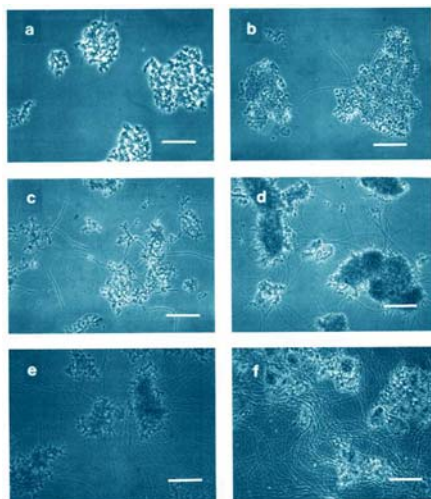
TIPOLOGIA DI TESSITURE DEI FIOCCHI DI FANGO ATTIVO

- Fiocco arrotondato, solido e compatto
- Fiocco irregolare e diffuso (con celle libere in sospensione)
- Fiocco con organismi zoogleali ramificati
- Fiocco con organismi zooleali amorfi



CLASSI DI ABBONDANZA DEI FILAMENTOSI (secondo Jenkins)

- Pochi
- Alcuni
- Moderati
- Frequenti
- Abbondanti
- Eccessivi



A3. Caratteristiche Morfologiche dei Filamentosi

LISTA BATTERI FILAMENTOSI INDICATORI:

Nocardia sp.	Nostocoida limicola
Microthrix parvicella	Type 0803
Sphaerotilus natans	Type 1851
Thiothrix spp.	Type 0961
Type 1701	Type 0675
Type 021N	Beggiatoa
Type 0041	Type 0581
Haliscomenobacter hydroxsis	Type 0914
Fungus	Flexibacter spp.
Type 0092	

Caratteristiche per l'identificazione dei principali batteri filamentosi
(in c.f. — assente, + presente, ++ abbondante)

Tipo di filamento	Osservazione in contrasto di fase (1000x)				
	Diametro Tricoma μm	Lunghezza Tricoma μm	Forma Tricoma	Localizzazione Tricoma	Forma e taglia media delle cellule μm
1 <i>S. natans</i>	1.0 - 1.8	100 - 1000	diritto, liev. curvo	esterno	bastoncelli ad estremità arroton. 1.4x2.0
2 Tipo 1701	0.6 - 1.0	10 - 100	liev. curvo, piegato	interno, esterno	bastoncelli ad estremità arroton. 0.8x1.2
3 Tipo 0041	1.2 - 1.6	100 - 500	dritto, liev. curvo	interno, esterno	quadrati 1.4x1.5
4 Tipo 0675	0.7 - 1.0	50 - 150	diritto	interno, esterno	quadrati 1.0x1.0
5 Tipo 021N	1.0 - 2.0	50 - 500	diritto liev. curvo	esterno	a banile, quadrati, rettangoli
6 <i>Thiothrix</i> I	1.4 - 2.5	100 - 500	diritto liev. curvo	esterno	discoidi di 1.2x1.5-2.0
7 <i>Thiothrix</i> II	0.8 - 1.4	50 - 200	diritto liev. curvo	esterno	rettangoli 2.0x3-5
8 Tipo 0914	0.7 - 1.0	50 - 200	diritto, liev. curvo	esterno, libero	rettangoli 1.0x1.5
9 <i>Beggiatoa</i> sp.	1.0 - 3.0	100 - 500	diritto liev. curvo	libero	quadrati 1.0x1.0
10 <i>M. parvicella</i>	0.6 - 0.8	100 - 400	convoluto	interno, libero	rettangoli 2.0x5.0
11 Tipo 0581	0.4 - 0.8	100 - 200	convoluto	interno, libero	cellule non visibili
12 <i>Nocardia</i> spp.	1.0	10 - 20	a rametto	interno, libero	cellule non visibili
13 Tipo 1863	0.8	20 - 50	piegato, convoluto	esterno, libero	bastoncelli ovali 0.8x1-1.5
14 <i>N. limicola</i> I	0.6 - 0.8	100 - 200	convoluto	interno, esterno	discoidi
15 <i>N. limicola</i> II	1.2 - 1.4	100 - 200	convoluto	interno, esterno	dischi, ovali 1.2x1.0
16 <i>N. limicola</i> III	1.6 - 2.0	200 - 300	convoluto	interno, esterno	dischi ovali 1.6x1.6
17 Tipo 1851	0.8	100 - 300	diritto, liev. curvo	esterno	rettangoli 0.8x1.5
18 Tipo 0961	0.8 - 1.4	40 - 150	diritto	esterno	rettangoli 1.0x2.0
19 Tipo 0092	0.8 - 1.0	10 - 60	diritto, piegato	interno	rettangoli 0.8x1.5
20 Tipo 0803	0.8	50 - 150	diritto	esterno, libero	rettangoli 0.8x1.5
21 <i>H. hydroxsis</i>	0.5	20 - 100	diritto, piegato	esterno, libero	cellule non visibili

(in c.c. — negativo, + positivo, V variabile)

Osservazione in contrasto di fase (1000 x)				Oss. campo chiaro			Elementi distintivi delle specie
Crescita batterica sessile	Guaina	Granuli di zolfo in situ	Altre inclusioni cellulari	Gram	Neisser		
					Tricoma	granuli	
1	-	+	-	+	-	-	false ramificazioni
2	++	+	-	+	-	-	crescita abbondante
3	++,-	+	-	-	+, V	-	guaina Neisser + in carenza di nutrienti
4	++,-	+	-	-	+, V	-	
5	-	-	-, +	+	-, V	-	rosette, gonidi, indentaz. al setto cellulare
6	-	+	+, -	+	-, +	-	rosette, gonidi
7	-	+	-, +	+	-	-	rosette, gonidi
8	-	-	-, +	+	-, +	-	granuli zolfo di forma irregolare
9	-	-	+, -	+	-, +	-	mobile, flessibile
10	-	-	-	+	+	+	Gram +, granuli Neisser+
11	-	-	-	+	-	-	
12	-	-	-	+	+	+	Gram +, vere ramificaz.
13	-	-	-	-	-	-, +	calena di cellule
14	-	-	-	-	+	-	setto difficile da vedere
15	-	-	-	+	-, +	+, -	setto cellul. ben visibile
16	-	-	-	+	+, -	+	indentazione al setto
17	-, +	+	-	-	+	-	setto cellul. ben visibile
18	-	-	-	-	-	-	indentazione al setto
19	-	-	-	+	-	+	setto cellul. ben visibile
20	-	-	-	-	-	-	indentazione al setto
21	-, +	+	-	-	-	-	

(Le schede dei singoli Filamentosi Indicatori possono essere richieste alla Società ANOVA)

A4. Caratteristiche Morfologiche dei Protozoi

(Le schede dei singoli Protozoi Indicatori possono essere richieste alla Società ANOVA).