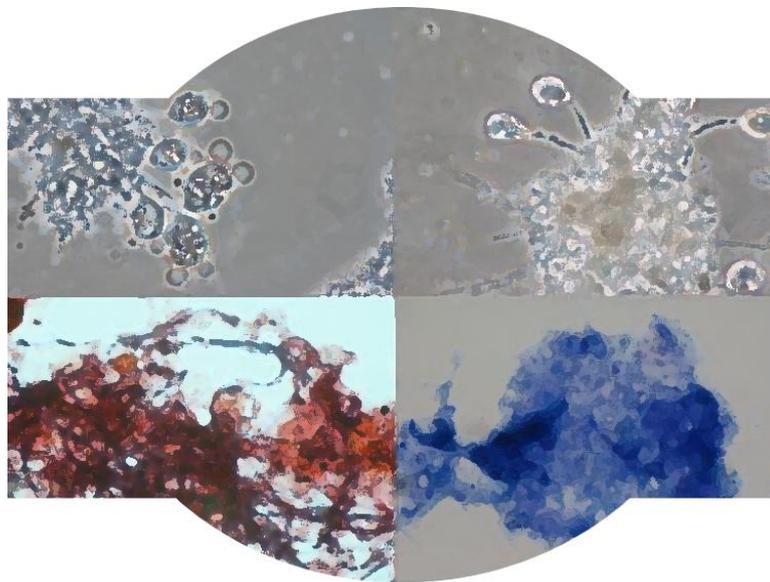


RESULTADOS DEL ENSAYO
INTERLABORATORIOS PARA FANGOS
ACTIVOS (17 febrero 2004)



GBS
Grupo Bioindicación Sevilla

ASOCIACIÓN CIENTÍFICA GRUPO
BIOINDICACIÓN SEVILLA

ÍNDICE

1. Introducción
2. Participantes
3. Resultados
4. Análisis de datos
 - Caracterización macroscópica y microscópica del fango activado
 - Estudio de la microfauna: bacterias filamentosas y protozoos
 - Otros parámetros de interés: SSLM, SSVLM, V30 e IVF.
5. Conclusiones
 - Generales
 - Valoración de la muestra
6. Consideraciones para los próximos ejercicios interlaboratorios
7. Agradecimientos
8. Bibliografía

Anexo fotográfico (se adjunta en un documento aparte debido a su gran tamaño)

1. INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de unificar criterios en los análisis de tipo microbiológico de fangos activos ("evaluación del fango: características macro- y microscópicas" y "evaluación de la microfauna: filamentos y protozoos"), GBS organiza ejercicios interlaboratorio con muestras de distintas características. Estos ensayos ofrecen la oportunidad de comparar los resultados y métodos con los demás laboratorios participantes a fin de detectar errores sistemáticos.

El ejercicio del día 17 de febrero de 2004 se realizó sobre una muestra puntual de Fango Activo de EDAR convencional, la cual se repartió junto con los formatos de remisión de datos.

La metodología de trabajo está descrita en el "Manual de trabajo" de GBS disponible en www.grupobioindicacionsevilla.com. Se informa a los participantes de modificaciones en las hojas de trabajo para los próximos ejercicios, según lo cual quedan recogidos nuevos parámetros tales como concentración de sólidos en suspensión del licor mixto (SSLM), sólidos en suspensión volátiles (SSVLM), ensayo de decantabilidad en probeta o V30, índice volumétrico de fangos (IVF) y la cuantificación de las bacterias filamentosas en disolución con la asignación de una categoría numérica. Los nuevos formatos serán facilitados en el próximo ejercicio, de fecha aproximada 11 de mayo de 2004, quedando igualmente a disposición de cualquier interesado en la web del grupo.

2. PARTICIPANTES

Durante este ejercicio, el total de participantes ha sido de 11. Aunque el número de laboratorios participantes se ha mantenido respecto a ejercicios anteriores, la experiencia de éstos en cuanto a la aplicación de las técnicas descritas en el manual de GBS es bastante variable. Así, en este ejercicio han intervenido 4 participantes que no habían trabajado con anterioridad con este tipo de metodología, 3 poseen un nivel medio de experiencia al haber participado anteriormente en otros interlaboratorios y 4 han empleado ampliamente esta metodología.

Para la mejor interpretación de algunos de los resultados que se mostrarán posteriormente, en la Tabla 1 se recoge el período transcurrido desde la toma de muestras hasta su análisis, para cada uno de los participantes.

Tabla 1. Días transcurridos en el análisis de la muestra desde su toma.

P1	P2	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P13
0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0

Pi= Participante 1-13

3. RESULTADOS

Los resultados más relevantes del análisis microscópico de la muestra, para cada uno de los participantes, se recogen en las Tablas 2 y 3. Se advierte a los participantes 4 y 13 de cambios en los valores aportados en el Índice de Fango (IF) por errores detectados en los sumatorios de las características macro- y microscópicas (señalados en rojo).

Tabla 2. Resultados aportados por los participantes 1, 2, 4, 5 y 6.

PARTICIPANTE	1	2	4	5	6
MACROSCOPIA	30	16,5	7,5	16,5	25,5
MICROSCOPIA	50	40	30	23	41
ÍNDICE DE FANGOS	80	57,5	37,5	39,5	66,5
C. DE FILAMENTOS	4	4	4 a 5	5	5
FILAMENTO DOMINANTE	Haliscomenobacter hydroxsis	Tipo 1851	Tipo 1702-H. hydroxsis	1702	1702
FILAMENTO 2 ^º	Tipo 1701, Tipo 1863	Tipo 0411, Tipo 1701	Tipo 1863, Tipo 1701	Tipo 021N/ Tipo 1863	Tipo 021N/ Tipo 1863
EFEECTO FLÓCULO	Disgregación	Puentes interfloc. y disgregac.	Disgregación flocular	Disgregación flocular	Disgregación flocular
OTROS FILAMENTOS	Beggiatoa, Tipo 0411	S. natans, H. hydroxsis	Thiothrix I, Thiothrix II y Beggiatoa	Bacillus sp., H. hydroxsis, Thiothrix I y II, 0411 y Beggiatoa	Bacillus sp., Tipo 1701
CORTES DIAGONAL	---	2,06	---	---	---
m/mL FILAMENTOS	---	---	418	3080,96	3071,68
DENSIDAD (org/L)	2,440,000	8,780,000	2,880,000	2,180,000	2,460,000
ÍNDICE DE SHANON	2,83	2,93	3,03	2,9	1,86
ÍNDICE DE MADONI	10	8	7	7	7
CLASE MADONI	Clase I	Clase I	Clase II	Clase II	Clase II
NÚMERO DE ESPECIES	11	19	17	17	10
GRUPO DOMINANTE	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles
SSLM	788 mg/L	850 mg/L	770 mg/L	825 mg/L	850 mg/L
SSVLM	0,881	---	625 mg/L	0,97	---
V30	280 mL/L	250 mL/L	310 mL/L	490 mL/L	450 mL/L
IVF	355 mL/g	294 mL/g	400 mL/g	594 mL/g	---
OBSERVACIONES	Categoría del fango buena-óptima Estructura flocular algo abierta, con disgregación flocular Características macroscópicas muy buenas Observaciones en cuanto a los filamentos: niveles de oxigenación bajos Parámetros asociados: fango estable y bien colonizado; excelente activ. biológica Calidad del agua tratada buena	Fango de buena decantabilidad con algunos flóculos en suspensión, color marrón claro y aspecto esponjoso Gran diversidad de protozoos Posee un índice volumétrico de fango elevado debido a la alta densidad de un determinado filamento en el medio Análisis de filamentos realizado a las 48 h: manojos de filamentos entrelazados que provocan puentes y dan lugar a disgregación y a una estructura abierta en el flóc. Organismos de bajos niveles de O.D y CM Valoración calidad fango: regular	Bulking filamentos por disgregación flocul. Baja concentración de sólidos en suspens en el tanque de aireación con decantación lenta Alto riesgo de sobrecargas y pérdida de biomasa en el clarificador secundario en momentos de punta caudal. Excesiva abundancia de bacterias de vida libre. Clarificado muy turbio. Gran diversidad de vorticelas debido fundamentalm. a la alta población de bacterias de vida libre. Bacterias filam. encontradas típicas de situaciones de déficit de oxígeno. Valoración calidad fango y agua salida mala	Se detecta cierta viscosidad en el fango. Mala flocculación (valores microscópicos bajos). Mala decantabilidad, fango bastante esponjado. Alta diversidad protozoaria y bacteriana. Alto cito disperso bacilar (unicelular). Filamentos asociados a : 1. deficiencia de oxígeno y nutrientes y 2. generadores de turbidez. La presencia de 1863 y Bacillus puede ser la causante del aspecto viscoso que presenta el fango, a pesar de mantener una baja [SSLM] Valoración calidad fango, agua salida y estabilidad del sistema: mala, buena y regular, respectiv. Fango en formación, competencia sp. Vorticella	Valoración calidad fango: buena Valoración calidad agua salida: regular Valoración estabilidad sistema: regular Filamentos indicadores de deficiencia de oxígeno y turbidez

por los distintos nichos

Tabla 3. Resultados aportados por los participantes 7, 8, 9, 10, 11 y 13.

PARTICIPANTE	7	8	9	10	11
MACROSCOPIA	16,5	25,5	21	16,5	12
MICROSCOPIA	40	34	31	38	25
ÍNDICE DE FANGOS	56,5	59,5	52	54,5	37
C. DE FILAMENTOS	4	5	4	4	4
FILAMENTO DOMINANTE	Tipo 1702	Haliscomenobacter hydrossis	Tipo 1702	Tipo 1702	H. hydrossis y Tipo 1702
FILAMENTO 2º	Tipo 1863	Tipo 1702	Tipo 1863 y H. hydrossis	H. hydrossis y Tipo 1863	Tipo 1863
EFFECTO FLÓCULO	Disgregación flocular	Disgregación	Disgregación flocular	Disgregación flocular	Disgregación flocular
OTROS FILAMENTOS	T 1701, T 021N, Thiothrix, H. hydrossis	Tipo 1863 y Tipo 0675	Tipo 0961	T 0411, Thiothrix I, T 0961, Beggiatoa sp., Bacillus sp.	Tipo 0411, bacilos y Tipo 021N
CORTES DIAGONAL	---	---	---	7,8	---
m/mL FILAMENTOS	---	---	---	---	---
DENSIDAD (org/L)	4,140,000	4,920,000	3,980,000	3,600,000	1,350,000
ÍNDICE DE SHANON	2,43	2,54	1,9	2,93	0,875
ÍNDICE DE MADONI	9	9	9	9	7
CLASE MADONI	Clase I	Clase I	Clase I	Clase I	Clase II
NÚMERO DE ESPECIES	14	12	15	16	6
GRUPO DOMINANTE	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles	Bacteriófagos sésiles
SSLM	---	---	---	---	---
SSVLM	---	---	---	---	---
V30	---	---	330 mL/L	280 mL/L	260 mL/L
IVF	---	---	---	---	---
OBSERVACIONES	Elevada turbidez del efluente por presencia de bact. libres en el espacio interflocular. Abundantes bacterias asociadas al flóculo, lo que dificulta la capacidad de compactac. del flóculo. Enorme variedad de cilios peritricos. Fango mal floculado, presencia de bacterias dispersas no asociadas al flóc. Valoración calidad fango, agua salida, estabilidad sistema: regular, regular y mala, respectivamente.	Fango disgregado debido a la alta presencia de bacterias filamentosas. La decantación es buena y el clarificado limpio de flóculos y turbidez. Las bacterias filamentosas indican bajos niveles de O.D y provocan disgregación flocular. Presencia de pequeños flagelados.	Alta cantidad de filamentos en disolución y filamentos de cito intraflocular característicos de condiciones de mala oxigenación. Valoración de la calidad del fango: regular	Fango joven, mal estructurado, de microfauna diversa pero repartida mayoritariamente en el grupo de los cilios sésiles, sin apenas presencia de repitantes. Presencia importante de filamentos de efecto disgregador, que sin embargo no parecen ser la única causa de la mala formación flocular. Filamentos en disolución que aportan turbidez. Microfauna poco madura y sistema de estabilidad regular, con unos rendimientos depur. estimados regulares	Observación microscópica 24 h después Fango de turbidez media-baja, sedimentabilidad media, alto número de filamentos en suspensión y olor "apropiado". Disgregación flocular ocasionada por filamentos indicadores de baja presencia de O.D

PARTICIPANTE	13
MACROSCOPIA	30
MICROSCOPIA	36
ÍNDICE DE FANGOS	66
C. DE FILAMENTOS	5
FILAMENTO DOMINANTE	1701
FILAMENTO 2º	Haliscomenobacter hydrossis
EFFECTO FLÓCULO	Disgregación flocular
OTROS FILAMENTOS	T 0961, T 0411, S. natans, Bacillus sp.
CORTES DIAGONAL	6,31
m/mL FILAMENTOS	---
DENSIDAD (org/L)	3,640,000
ÍNDICE DE SHANON	2,41
ÍNDICE DE MADONI	8
CLASE MADONI	Clase I
NÚMERO DE ESPECIES	12
GRUPO DOMINANTE	Bacteriófagos sésiles
SSLM	---
SSVLM	---
V30	---
IVF	---
OBSERVACIONES	Valoración calidad del fango: bueno Valoración agua salida: buena Valoración de la estabilidad del sistema: buena

4. ANÁLISIS DE DATOS

En este apartado se realizará un análisis estadístico de los valores obtenidos en cada uno de los puntos en los que está dividido el análisis de fangos activos. Los parámetros estadísticos seleccionados son:

El cálculo de la *media*, que informa sobre el valor más probable de la variable a estudiar. Se afecta fuertemente por los valores extremos de la población.

La *desviación estándar*: muestra como de agrupados o dispersos se encuentran los valores. Si la *varianza* tiende a cero, quiere decir que la dispersión de los datos es muy baja y éstos se encuentran concentrados en torno a la media.

Coefficiente de Variación: es la desviación típica expresada como un porcentaje de la media. Es ampliamente utilizado cuando se quiere comparar la variación de dos o más poblaciones, independientemente de la magnitud de sus medidas.

Test de la Q de Dixon: tiene en cuenta la diferencia de los valores máximos y mínimos respecto a la media, inhabilitando aquéllos que superen el valor preestablecido para este estimador. Dada la dispersión natural de los datos biológicos, y más aún de este tipo de análisis que no presentan capacidad de contraste con un patrón, hemos preferido realizar una invalidación de medidas.

□ CARACTERIZACIÓN MACRO- Y MICROSCÓPICA DEL FANGO ACTIVO

- MACROSCOPIA

MACROSCOPIA	
1	30
2	16,5
4	7,5
5	16,5
6	25,5
7	16,5
8	25,5
9	21
10	16,5
11	12
13	30
MEDIA	20
VARIANZA	7,28
PARTICIP DESCARTADO	4
MEDIA CORREG	21
VAR CORREG	6,36

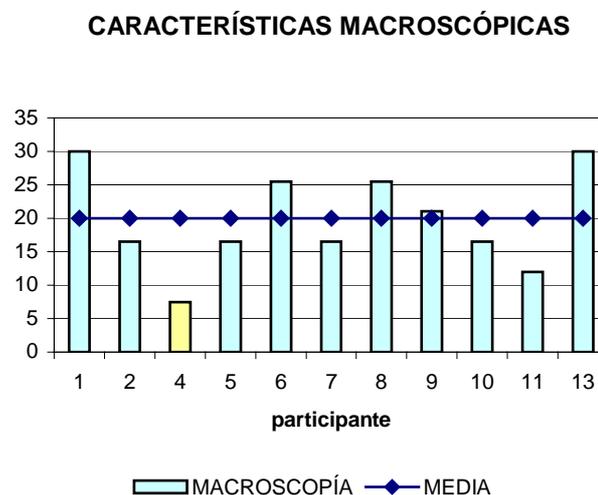


Figura 1. Características macroscópicas de la muestra "totales" (Σ [turbidez, flóculos en suspensión, sedimentabilidad y olor]) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Descartado el participante 4 según *el test de la Q de Dixon*.

Las categorías con las que fueron evaluadas cada una de las características macroscópicas de la muestra, por cada uno de los participantes, aparecen recogidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Características macroscópicas de la muestra (turbidez del clarificado, flóculos en suspensión en el clarificado, sedimentabilidad y olor) para cada uno de los participantes.

PARTICIPANTE	TURBIDEZ	FLÓC. EN SUSP.	SEDIMENTAB.	OLOR
1	Baja	Baja	Alta	Agradable
2	Media	Media	Media	Agradable
4	Alta	Alta	Media	Agradable
5	Media	Baja	Baja	Agradable
6	Baja	Baja	Media	Agradable
7	Alta	Baja	Media	Agradable
8	Baja	Baja	Media	Agradable
9	Baja	Media	Media	Agradable
10	Media	Media	Media	Agradable
11	Media	Alta	Media	Agradable
13	Baja	Baja	Alta	Agradable

- MICROSCOPIA

MICROSCOPIA	
1	50
2	41
4	30
5	23
6	41
7	40
8	34
9	31
10	38
11	25
13	36
MEDIA	35
VARIANZA	7,85

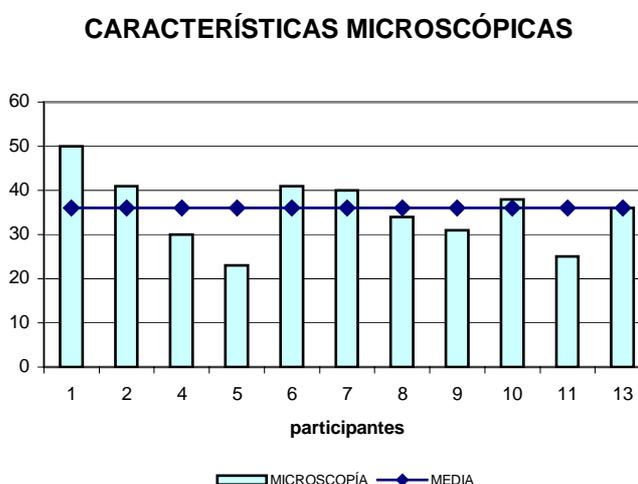


Figura 2. Características microscópicas de la muestra (totales) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Ningún participante descartado.

Las categorías con las que fueron evaluadas cada una de las características microscópicas de la muestra, por cada uno de los participantes, aparecen recogidas en la Tabla 5.

Tabla 5. Características microscópicas de la muestra (forma, tamaño, estructura, textura y cobertura flocular, filamentos en flóculos y en disolución, diversidad de especies) para cada uno de los participantes.

PARTICIPANTE	FORMA	TAMAÑO	ESTRUCTURA	TEXTURA	COBERTURA	FIL EN FLÓC.	FIL EN DIS.	DIV PROTOZ
1	Irregular	Medio	Media	Fuerte	10-50%	5-20 fil/flóc.	Baja	>7 sp.
2	Irregular	Medio	Abierta	Fuerte	10-50%	5-20 fil/flóc.	Baja	>7 sp.
4	Irregular	Medio	Abierta	Débil	10-50%	> 20 fil/flóc.	Baja	>7 sp.
5	Irregular	Medio	Abierta	Débil	<10%	> 20 fil/flóc.	Baja	>7 sp.
6	Irregular	Medio	Media	Fuerte	<10%	< 5 fil/flóc	Alta	4-7 sp.
7	Irregular	Medio	Media	Fuerte	10-50%	> 20 fil/flóc.	Alta	>7 sp.
8	Irregular	Medio	Abierta	Fuerte	10-50%	> 20 fil/flóc.	Baja	>7 sp.
9	Irregular	Medio	Abierta	Fuerte	10-50%	> 20 fil/flóc.	Alta	>7 sp.
10	Irregular	Medio	Abierta	Fuerte	10-50%	5-20 fil/flóc.	Alta	> 7sp.
11	Irregular	Medio	Abierta	Fuerte	10-50%	> 20 fil/flóc.	Alta	4-7 sp.
13	Irregular	Pequeño	Media	Fuerte	<10%	5-20 fil/flóc.	Baja	> 7sp.

- ÍNDICE DE FANGO

ÍNDICE DE FANGO (IF)		CATEGORÍA
1	80	Bueno
2	57,5	Regular
4	37,5	Malo
5	39,5	Malo
6	66,5	Bueno
7	56,5	Regular
8	59,5	Regular
9	52	Regular
10	54,5	Regular
11	37	Malo
13	66	Bueno
MEDIA	55	
VARIANZA	13,37	

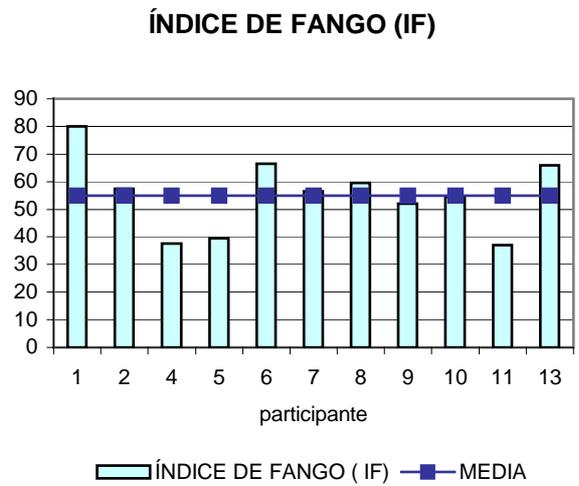


Figura 3. IF (sumatorio de las características macro- y microscópicas) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Ningún participante descartado.

□ ESTUDIO DE LA MICROFAUNA: BACTERIAS FILAMENTOSAS Y PROTOZOOS

- ABUNDANCIA DE BACTERIAS FILAMENTOSAS (CATEGORÍA NUMÉRICA)

Para aquellos participantes que estimaron abundancias de filamentos como situaciones intermedias entre dos categorías numéricas, se ha trabajado con el valor que representa la media aritmética de dichas categorías.

CATEGORÍA BACTERIANA	
1	4
2	4
4	4,5
5	5
6	5
7	4
8	5
9	4
10	4
11	4
13	5
MEDIA	4,4
VARIANZA	0,49

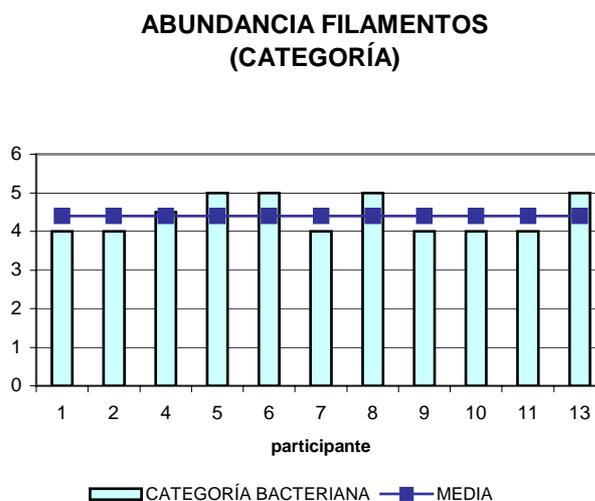


Figura 4. Abundancia de bacterias filamentosas (categoría numérica) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Ningún participante

- DENSIDAD PROTOZOARIA

DENSIDAD PROTOZOARIA (10exp 6)	
1	2,44
2	8,78
4	2,88
5	2,18
6	2,46
7	4,14
8	4,92
9	3,98
10	3,60
11	1,35
13	3,64
MEDIA	3,67
VARIANZA	1,98
PARTICIP DESCARTADO	2
MEDIA CORREG	3,16
VAR CORREG	1,08

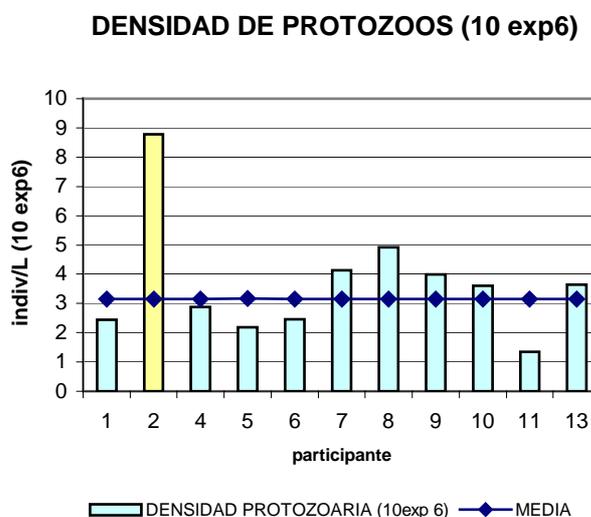


Figura 5. Densidad de microorganismos (protozoos y metazoos) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Descartado el participante 2.

- ÍNDICE DE SHANNON

ÍNDICE DE SHANNON	
1	2,83
2	2,93
4	3,03
5	2,9
6	1,86
7	2,43
8	2,54
9	1,9
10	2,93
11	0,87
13	2,41
MEDIA	2,42
VARIANZA	0,66
PARTICIP DESCARTADO	11
MEDIA CORREG	2,58
VAR CORREG	0,43

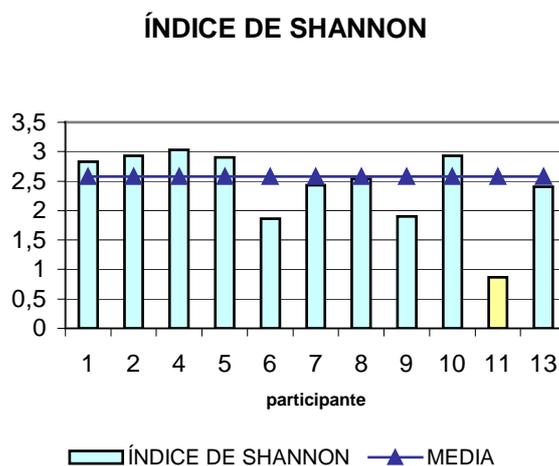


Figura 6. Índice de Shannon (medida de la diversidad de la muestra) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Participante 11 descartado.

- ABUNDANCIA DE BACTERIAS FILAMENTOSAS (OTROS SISTEMAS DE CUANTIFICACIÓN)

A continuación, en las Tablas 6 y 7, se recogen los resultados referentes a "otros procedimientos de cuantificación de organismos filamentosos". Tan sólo seis participantes han cumplimentado este apartado, de los que tres emplearon la técnica basada en el cálculo de los "m/mL filamentos" y otros tres participantes utilizaron la técnica de "cortes con la diagonal". Con relación a la primera técnica, el análisis de los datos determinó que el participante a descartar debía ser el 4 (Tabla 6). En cuanto a la segunda técnica, los resultados presentaron una varianza elevada, aunque el test de invalidación de medidas no concluyó que fuera necesario excluir a ningún participante (Tabla 7).

Tabla 6. Cuantificación de los filamentos de la muestra como "m/mL filamentos". Descartado el participante 4.

RECuento FILAMENTOS (m/mL filamentos)	
1	---
2	---
4	418
5	3081
6	3072
7	---
8	---
9	---
10	---
11	---
13	---

Media: 2190; Varianza: 1535; Coeficiente Variación (sin exclusión): 70%
 Valores corregidos eliminando al participante 4:
Media: 3076; Varianza: 6,4

Tabla 7. Cuantificación de los filamentos de la muestra como "cortes con la diagonal".

RECuento FILAMENTOS (CORTES DIAGONAL)	
1	---
2	2,06
4	---
5	---
6	---
7	---
8	---
9	---
10	7,8
11	---
13	6,31

Media: 5; Varianza: 2,98; Coeficiente de Variación: 55%
 Ningún participante descartado

Al tratarse de dos poblaciones de datos de muy distinta medida, la dispersión ha sido calculada, además, con base al *Coeficiente de variación*.

Como se observa en ambas figuras, la dispersión de los resultados obtenidos con ambos métodos es amplia.

Por esta razón, se solicita a los participantes la cumplimentación de este apartado en ejercicios consecutivos a fin de obtener datos suficientes sobre los que extraer conclusiones y estudiar la posibilidad de modificar la metodología empleada, lo que sería tratado como un punto de discusión en la reunión final que se convocará al final del circuito.

- ÍNDICE DE MADONI

En la Figura 7 se representa el SBI o Método Madoni atendiendo a la categoría numérica estimada por cada uno de los participantes. En la Figura 8, el SBI es representado atendiendo a la "clase" final de fango.

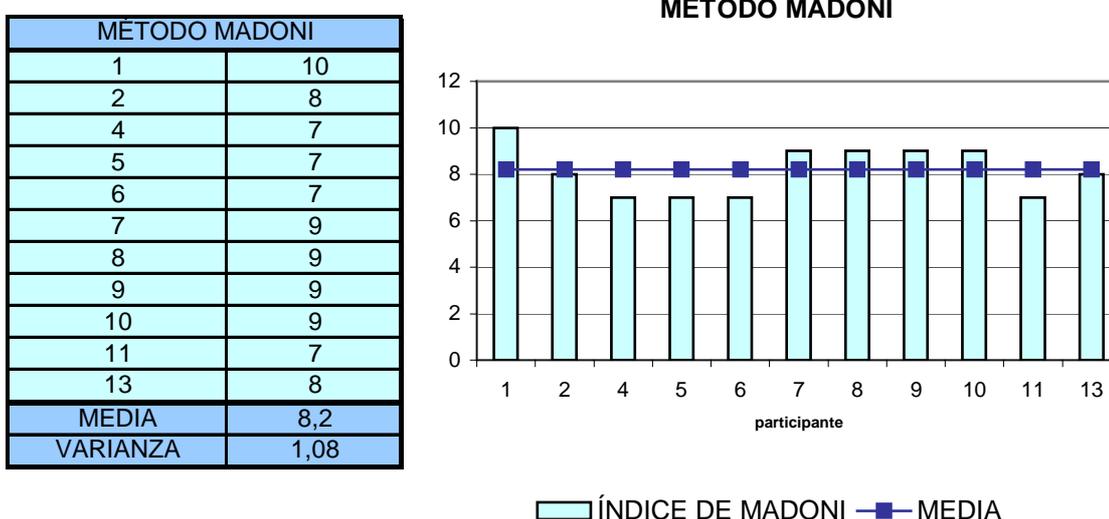


Figura 7. Índice de Madoni (1-10) para cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Descartado el participante 2.

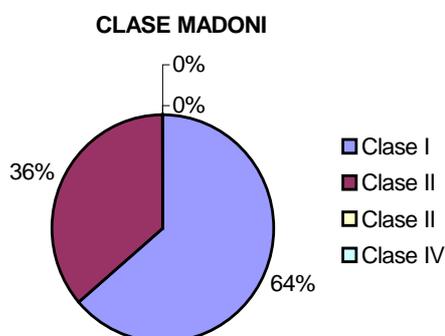


Figura 8. Clase Madoni (I-IV) definida por el total de participantes.

- N° ESPECIES PROTOZOARIAS

N° DE ESPECIES PROTOZOARIAS	
1	11
2	19
4	17
5	17
6	10
7	14
8	12
9	15
10	16
11	6
13	12
MEDIA	13,5
VARIANZA	3,78

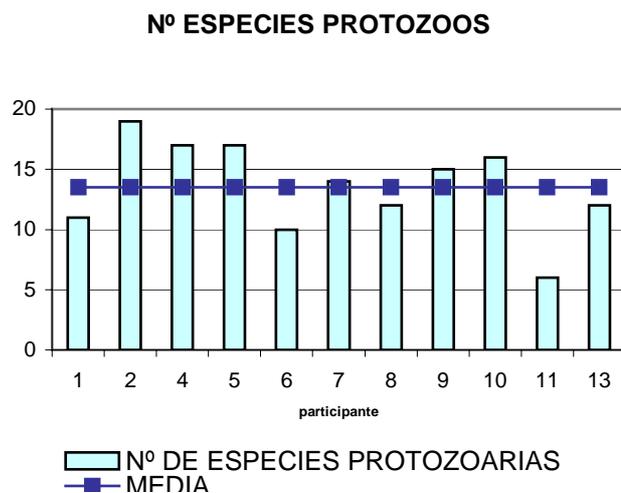


Figura 9. Número de especies protozoarias identificadas por cada uno de los participantes, así como la media y varianza calculadas. Ningún participante descartado.

- GRUPO FUNCIONAL DOMINANTE (PROTOZOOS)

GRUPO DOMINANTE	
1	B. sésiles
2	B. sésiles
4	B. sésiles
5	B. sésiles
6	B. sésiles
7	B. sésiles
8	B. sésiles
9	B. sésiles
10	B. sésiles
11	B. sésiles
13	B. sésiles

Figura 10. Grupo funcional dominante determinado para el cálculo del Método Madoni por cada uno de los participantes. Abreviatura: B. sésiles= Bacteriófagos sésiles.

- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FILAMENTOSAS

En la Tabla 8 se exponen los filamentos dominante, secundario así como "otros filamentos" identificados durante el examen microscópico por el total de participantes.

Tabla 8. Filamentos dominantes, secundarios y otros filamentos presentes en la muestra según el criterio de cada participante.

FILAMENTOS	DOMINANTE	SECUNDARIO	OTROS
1	H. hydrossis	T 1701/T 1863	Beggiatoa, T 411
2	Tipo 1851	Tipo 0411, Tipo 1701	S. natans, H. hydrossis
4	T 1702-H. hydrossis	T 1863/T 1701	Thiothrix I y II, Beggiatoa
5	Tipo 1702	T 021N/ T1863	Bacillus, H. hydrossis, T 1701, Thiothrix II, T 0411, Beggiatoa
6	Tipo 1702	T 021N/ T1863	Bacillus, T ipo 1701
7	Tipo 1702	Tipo 1863	T 1701, T 021N, Thiothrix, H. hydrossis
8	H. hydrossis	Tipo 1702	Tipo 1863, Tipo 0675
9	Tipo 1702	T 1863 y H. hydrossis	T 0961
10	Tipo 1702	H. hydrossis y Tipo 1863	T 0411, Thiothrix I, T 0961, Beggiatoa sp., Bacillus sp.
11	H. hydrossis y Tipo 1702	Tipo 1863	Tipo 0411, bacilos y Tipo 021N
13	Tipo 1701	H. hydrossis	T 0961, T 0411, S. natans, Bacillus sp.

De la información recogida en la Tabla 8 se extrae que la mayoría de los participantes sitúa al Tipo 1702 como uno de los filamentos dominantes. Aunque en menor proporción que el anterior, el organismo *Haliscomenobacter hydrossis* es considerado por algunos participantes como dominante y por otros como secundario. El filamento Tipo 1863, en una importante proporción (el 73%), ha sido identificado como organismo secundario.

El principal efecto del crecimiento filamentosos detectado por la mayoría de los participantes ha sido la "disgregación flocular", aunque la presencia del Tipo 1863 en disolución también ha sido registrada como causa de la turbidez detectada en el clarificado.

- LISTADO DE ESPECIES DE PROTOZOOS Y GRUPOS DE METAZOOS

En la Tabla 9 se recogen, por grupos funcionales, las especies de protozoos y los grupos de metazoos observados por la totalidad de participantes.

Tabla 9. Protozoos y grupos de metazoos observados por el total de participantes.

Especies de protozoos y Grupos de metazoos	
Pequeños flagelados	Presentes
Grandes flagelados	<i>Euglena</i> sp.
Amebas desnudas	Presentes
Tecamebas	Presentes sin especificar sp.
Carnívoros nadadores	<i>Litonotus</i> sp.
Carnívoros suctores	<i>Tokophrya</i> sp. <i>Acineta</i> sp. <i>Podophrya</i> sp. <i>Suctor</i> sin identificar
Bacteriófagos nadadores	<i>Uronema</i> sp. <i>Paramecium</i> sp. Bacteriófago nadador sin identificar
Bacteriófagos reptantes	<i>Aspidisca</i> sp. <i>Stylonichia</i> sp. <i>Acineria</i> sp. Reptante sin identificar sp.
Bacteriófagos sésiles	<i>Stentor</i> sp. <i>Carchesium</i> sp. <i>Epistylis</i> sp. <i>Epistylis plicatilis</i> <i>Opercularia</i> sp. <i>Vorticella convallaria</i> <i>Vorticella campanula</i> <i>Vorticella microstoma</i> <i>Vorticella banatica</i> <i>Vorticella infusionum</i> <i>Vorticella striata</i> <i>Vorticella aquadulcis-complex</i> <i>Vorticella vernalis</i> Vorticella sin identificar
Metazoos	Nematodos Anélidos

Como se deduce de la Tabla 9, al margen de las discrepancias entre participantes, se trata ésta de una muestra de buena diversidad y densidad poblacional media (Figura 5). Sin embargo, la diversidad de especies y una proporción importante de la densidad poblacional total está sectorizada hacia el grupo de los ciliados sésiles y más concretamente al de las vorticelas. No obstante, la presencia de ciliados reptantes, de aparición deseable en ecosistemas maduros ha sido muy reducida.

En la Tabla 10 se recoge el conjunto de especies observado por cada uno de los participantes.

Tabla 10. Especies observadas por cada uno de los participantes.

PARTICIPANTE	ESPECIES OBSERVADAS
1	Litonotus sp., Tokophrya sp., B. nadador, Aspidisca sp., Acineria sp., Epistylis sp., Opercularia sp., V. microstoma, V. convallaria, V. campanula, Nematodos
2	Peq.flagelados, Tecameba, A. desnuda, Litonotus sp., Podophrya sp., Tokophrya sp., Uronema sp., Paramecium sp., B. nadador, Aspidisca sp., Acineria sp., Stentor sp., B. reptante, Carchesium sp., Epistylis sp., V. microstoma, V. convallaria, B.sésil, Nematodos
4	Peq. flagelados, G.flagelados, Litonotus sp., Tokophrya sp., Suctor, Uronema sp., Aspidisca sp., Acineria sp., B. reptante, V. vernalis, Epistylis sp., Opercularia sp., V. striata, V. convallaria, V. infusioinum, V. banatica, V. aquadulcis, Nematodos
5	G. flagelados, Litonotus sp., Tokophrya sp., Suctor, B. nadador, Aspidisca sp., Acineria sp., Stylonichia sp., Epistylis sp., V. banatica, V. microstoma, V.convallaria, V. infusioinum, V. campanula, V. vernalis, Nematodos
6	Euglena sp., B. nadador, Aspidisca sp., Epistylis sp., V. banatica, V. microstoma, V. convallaria, V. infusioinum, Vorticella sp., Nematodos
7	Acineta sp., Aspidisca sp., Acineria sp., Epistylis sp., V. microstoma, V. convallaria, V. infusioinum, V. banatica, V. campanula, V. striata, Anélidos
8	Litonotus sp., Podophrya sp., B. nadador, Aspidisca sp., Acineria sp., V. banatica, Opercularia sp., V. microstoma, V. convallaria, V.striata, B. sésil
9	Euglena sp., Litonotus sp., Podophrya sp., Tokophrya sp., B. nadador, Aspidisca sp., B. reptante, Epistylis sp., V. microstoma, V. convallaria, V. campanula, V. vernalis, V. aquadulcis
10	Euglena sp., Litonotus sp., Podophrya sp., Tokophrya sp., Uronema sp., B. nadador, Aspidisca sp., Acineria sp., B. reptante, Epistylis sp., E. plicatilis, V. microstoma, V. convallaria, V. vernalis, V. aquadulcis, Vorticella sp. (?), V. infusioinum, Nematodos
11	Pequeños flagelados, Aspidisca sp., Epistylis sp., V. microstoma, V. convallaria, Vorticella sp., Nematodos
13	Tecamebas, Litonotus sp., Acineta sp., Podophrya sp., B. nadador, Aspidisca sp., Epistylis sp., Opercularia sp., V. microstoma, V. convallaria, B. sésil, Nematodos

- RELACIÓN DE PORCENTAJES DE PROTOZOOS

En la Tabla 11 se recoge la abundancia relativa de cada grupo funcional estimada por cada participante.

Tabla 11. Porcentajes de abundancia de los distintos grupos funcionales obtenidos por cada uno de los participantes.

PARTICIPANTE	G. FLAG (%)	AMEBAS (%)	TECAMEBAS (%)	C. NADAD (%)	C. SUCTOR (%)	B. NADAD (%)	B. REPT (%)	B. SÉSIL (%)	METAZOOS (%)
1	0	0	0	2	1	1	9	86	2
2	0	0	2	1	1	5	8	82	0
4	1	0	0	1	3	1	7	85	1
5	1	0	0	3	2	2	9	81	3
6	1	0	0	0	0	1	1	97	1
7	0	0	0	0	1	0	6	92	0
8	0	0	0	1	2	2	2	92	0
9	0,5	0	0	0,5	0,5	0	2	95,9	0,5
10	1	0	0	0	1	2	7	87	1
11	0	0	0	0	0	0	2,2	96,25	1,48
13	0	0	19	0	2	6	3	68	1

Abreviaturas: G. FLAG: grandes flagelados; AMEBAS: amebas desnudas; C. NADAD: carnívoros nadadores; C. SUCTOR: carnívoros suctores; B. NADAD: bacteriófagos nadadores; B.REP: bacteriófagos reptantes; B. SÉSIL: bacteriófagos sésiles; METAZOOS: metazoos.

□ **OTROS PARÁMETROS DE INTERÉS: SSLM, SSVLM, V30 e IVF.**

En la Tabla 12 se recogen los datos referentes a la concentración de sólidos en suspensión del licor mixto (SSLM), sólidos en suspensión volátiles (SSVLM), ensayo de decantabilidad en probeta (V30) e índice volumétrico de fangos (IVF).

PARTICIPANTES	SSLM (mg/L)	SSVLM (mg/L)	V30 (mL/L)	IVF (mL/g)
1	788	694	280	355
2	850	-	250	294
4	770	625	310	400
5	825	800	490	594
6	850	-	450	-
7	-	-	-	-
8	-	-	-	-
9	-	-	330	-
10	-	-	280	-
11	-	-	260	-
13	-	-	-	-
MEDIA	817	706	331	411
VARIANZA	36,4	88,1	90,0	129,7
COEF. VARIACIÓN	4,5	12,5	27,2	31,5

Tabla 12. Valores en la concentración de sólidos en suspensión (totales y volátiles), V30 e IVF aportados por los participantes, así como las medias, varianzas y coeficientes de variación. Ningún participante descartado.

Aunque tan sólo parte de los participantes presentaron estos datos, se ha realizado igualmente el estudio estadístico de los mismos. Entre las medidas de dispersión de los datos se ha incluido el *Coficiente de Variación* al tratarse de poblaciones de datos con valores medios distintos y por tanto con desviaciones típicas también diferentes.

Consideramos conveniente que todos los participantes realicen el esfuerzo de cumplimentar este apartado, a fin de poder llegar a conclusiones más claras que las que puedan extraerse de datos tan escasos como los aquí presentes.

5. CONCLUSIONES

□ VALORES MEDIOS ESTIMADOS DE LA MUESTRA ANALIZADA

En la Tabla 13 se recogen los valores medios de los principales parámetros que definen la calidad de la muestra estudiada.

Tabla 13. Valores medios estimados de la muestra analizada a partir de los resultados obtenidos por el total de participantes, calculados como la media aritmética de los valores numéricos.

RESULTADOS MEDIOS ESTIMADOS DE LA MUESTRA	
ÍNDICE DE FANGO	55 ("Regular")
CATEGORÍA BACTERIANA	4
IDENTIFICACIÓN DE FILAMENTOS	Tipo 1702 / H. hydrossis / Tipo 1863
EFFECTOS DE LOS FILAMENTOS	Disgregación flocular y Turbidez
DENSIDAD PROTOZOARIA APROXIMADA	$3,16 \times 10^6$ indiv./L
ÍNDICE DE MADONI	8
CLASE MADONI	Clase I
Nº DE ESPECIES ENCONTRADAS	13
GRUPO DOMINANTE	Bacteriófagos sésiles
RENDIMIENTO SEGÚN MADONI	Muy buen funcionamiento

□ CONCLUSIONES GENERALES

Las presentes conclusiones se han obtenido como compendio de las observaciones realizadas por el total de participantes.

- *Calidad previsible del agua tratada:* regular-buena.

En cuanto a la justificación de esta conclusión, sería necesario aclarar que la mayoría de analistas que ha estimado una calidad "regular" del agua depurada, lo ha hecho con base a las siguientes observaciones:

■ La evaluación de la *turbidez* del clarificado efectuada por cada laboratorio ha sido decisiva en la calificación de la calidad del efluente final. Para aquellos que evaluaron de forma negativa la turbidez, atribuyen la presencia de organismos filamentosos en disolución como causa principal de ésta (Tipo 1863, *Bacillus* sp.) (Lámina 6, Figuras e-f); si bien han existido participantes que han registrado la presencia de crecimiento disperso bacilar (unicelular), circunstancia ésta ilustrada en la Lámina 9 (Figura b) como causa igualmente de turbidez en el clarificado.

■ La presencia de *flóculos en suspensión*, consecuencia del mal estado estructural del fango, ha sido valorada por algunos participantes como un factor de "riesgo de sobrecarga y pérdida de biomasa en el clarificador secundario en momentos de caudal punta".

■ Deficiente estructuración flocular (Anexo fotográfico, Lámina 6), consecuencia del crecimiento filamentosos de organismos de efecto disgregador, principalmente, y asociados comúnmente a oxigenación insuficiente. La *sedimentabilidad* del fango, evaluada mayoritariamente como "media", es consecuencia del estado de mala formación flocular detectado, que en el caso de algunos participantes ha sido atribuido, adicionalmente, a un cierto *carácter viscoso* del fango. Dicho carácter viscoso, que contrasta con la baja concentración de SSLM típico en este tipo de fenómenos de alteración de la sedimentabilidad, ha quedado ilustrado por síntomas típicos de deficiencia nutricional de observación microscópica: abundantes acúmulos de bacterias Neisser positivas de crecimiento intraflocular (en tanques de aireación que no cumplen la secuencia anaerobiosis/aerobiosis) (Lámina 9, Figura e), presencia abundante de gránulos de poli- β - hidroxibutirato en bacterias floculantes y filamentosas (Lámina 9, Figura f), formación de rosetas y gonidios de *Thiothrix* spp. (Lámina 7, Figuras c-e) (Jenkins *et al.*, 1993).

- *Tiempo de retención celular* pequeño y *baja concentración de sólidos en suspensión*. Una apreciación bastante repetida entre los participantes ha sido la conveniencia de controlar la edad de fangos del sistema para favorecer, además de la madurez de la microfauna que se desarrolla en él, un mejor estado de formación flocular. Esta circunstancia, que señala hacia un sistema joven, la hemos considerado como responsable de la mayor dispersión en los resultados obtenidos entre los distintos participantes, al permitir una evolución mayor de las características de la muestra que un sistema más estable y maduro.

- Valoración de la *estabilidad del sistema*: regular-mala.

En este apartado, ha sido valorada de forma muy negativa la importante sectorización de las especies y de la densidad poblacional total de la muestra a favor del grupo de las vorticelas. Conclusiones que han sido adoptadas por una importante proporción de participantes, pese a que la mayoría de éstos ha estimado un SBI alto que sitúa a la muestra entre las clases I y II (indicativas de buenos rendimientos en la depuración) y ha calculado un Índice de Shannon también alto. Ésto es así porque la muestra que nos ocupa está ampliamente colonizada por vorticelas, indicando la presencia abundante de bacterias en disolución (Lámina 9), al tratarse éstas de ciliados sésiles de alimentación bacteriófaga. De hecho, la abundante presencia de larvas trocóforas y vorticelas

en estado de gemación y escisión longitudinal, confirman que se trata ésta de una muestra de fango joven en la que la población de vorticelas se encuentra en pleno desarrollo (Lámina 3, Figuras a-d). Es de suponer que el abundante crecimiento disperso de bacterias hace posible el desarrollo de esta población sin apenas presión competitiva entre las distintas especies (obsérvense las Láminas 2-4 del anexo fotográfico en las que se recoge una gran variedad de tipos morfológicos). Es esperable que, si las condiciones ambientales evolucionan haciendo favorable la estabilidad del sistema, la población reduzca sus efectivos poblacionales a favor de un número de especies más reducido y especializado en las condiciones ambientales finalmente fijadas.

Es sabido que condiciones de transitoriedad en las instalaciones pueden dar lugar a incrementos en la densidad de población de estos ciliados: rápido aumento de la carga másica debido a pérdidas o extracciones de fangos, carga orgánica introducida de modo discontinuo, etc. (Madoni, 1994). Por su parte, la ausencia de ciliados reptantes en la muestra, organismos que en ecosistemas maduros suelen encontrarse en situación de "co-dominancia" con los sésiles, nos indica la falta de idoneidad del sustrato sobre el que se desarrolla este grupo: el flóculo de fango activo. En Madoni (1994) se menciona la relación inversa existente entre los ciliados reptantes y el IVF.

Este tipo de apreciaciones y de actitudes por parte del analista merece ser valorado de forma muy positiva. Sin duda alguna, la información que se deriva de la aplicación de índices bióticos es valiosa, si bien hemos de ser conscientes de que no existe el "índice perfecto". En este sentido, la experiencia del especialista juega un papel primordial a la hora de procesar la información procedente de estos "sistemas de análisis", quien además tratará de contrastarla con información aportada por otras fuentes: otros sistemas de análisis de datos o índices, parámetros físico-químicos u operacionales de los que disponga sobre la planta, etc.

- *V30 estimada*: 330 mL.
- *SSLM estimada*: 820 mg/L.
- *IVF estimada*: 411 mL/g.

ÍNDICE DE FANGO

Los resultados obtenidos en cuanto a *características macroscópicas* han resultado especialmente variables entre los distintos participantes (Tabla 4). A continuación, se presentan los porcentajes con los que los laboratorios definieron las distintas categorías que describen los parámetros de tipo macroscópico:

- *Turbidez*: 18% "alta", 36,5% "media" y 45,5% "baja"
- *Flóculos en suspensión*: 18% "alta", 27% "media" y 54,5% "baja"
- *Sedimentabilidad*: 18% "alta", 73% "media" y 9% "baja"
- *Olor*: 100% "agradable"

Tomando como categorías "medias" aquellas seleccionadas por el porcentaje mayor de participantes, la calidad de la muestra queda definida de la siguiente manera (Tabla 14):

Tabla 14. Características macroscópicas "medias" de la muestra.

Características macroscópicas	Categoría "media"
<i>Turbidez</i>	Baja-media
<i>Flóculos en suspensión</i>	Bajo
<i>Sedimentabilidad</i>	Media
<i>Olor</i>	Agradable

Si se toma como referencia el valor de la media calculada sobre las características macroscópicas, es decir, 20 puntos sobre 30, se obtiene que: el 54,5% de los participantes ha evaluado con una puntuación < 20 (sobre 30) y el 45,5% restante lo ha hecho con una puntuación > 20 (sobre 30) (Figura 1 y Tabla 4).

Las dos características macroscópicas que han registrado mayor variabilidad han sido la *turbidez* y la presencia de *flóculos en suspensión* en el clarificado. Al igual que en el ejercicio anterior, ambas características son las que presentan mayor dispersión entre los distintos informes. Esta situación, probablemente, es resultado de la experiencia acumulada en planta por cada uno de los analistas y del establecimiento de criterios propios en función a las características de las muestras con la que cada uno de éstos acostumbra a tratar. Por tanto, se señala este punto como uno de los apartados a tratar en la reunión final a la que todos los participantes seremos convocados una vez concluido el circuito de ejercicios interlaboratorios.

Sin embargo, respecto a la variabilidad hallada en las características macroscópicas, es conveniente señalar que la muestra seleccionada era un fango joven, que como tal es más propenso a experimentar cambios en sus propiedades físicas y microbiológicas que otro de edad de fango más avanzada y, consiguientemente, de propiedades más estables.

Con relación a esta última cuestión, hemos considerado que el protocolo de conservación de muestras seguido por cada uno de los participantes, así como el tiempo transcurrido hasta la realización del análisis, han podido tener repercusión en el estado de la muestra y en la evaluación final del fango. Por este motivo, GBS, que está llevando a cabo experiencias relacionadas con los protocolos de conservación de muestras, quiere mostrar de forma muy esquemática las diferencias halladas por un mismo analista en la evaluación de las características macroscópicas de esta muestra para distintas pautas de conservación (con o sin refrigeración en nevera) y tiempos transcurridos entre la toma de muestras y la observación (2 y 9 horas) (Tabla 15).

Tabla 15. Valoración de las características macroscópicas de la muestra tras distintos tiempos de espera y diferente conservación.

Tiempo/conservación	Turbidez	Flóc. en susp.	Sedimentabilidad	Olor
2h / tª ambiente	Baja-media*	Medio-bajo*	Media	Agradable
9h / tª ambiente	Media	Medio	Media	Agradable
9h / refrigeración en nevera (4° C)	Media-alta*	Medio	Media	Desagradable

*Las características macroscópicas que quedaron definidas con dos categorías, deben de ser entendidas de forma que la primera característica expuesta es aquella que define en mayor proporción a la muestra, mientras que la segunda complementa la definición de ésta al indicar una cierta tendencia de dicha muestra a ser calificada de esa manera.

De la Tabla 15 se deduce que las características macroscópicas que son afectadas en mayor proporción por la conservación en nevera de la muestra son la turbidez y el olor. Nuestra experiencia nos indica que, salvo para la observación de filamentos, la valoración de las características macro- y microscópicas de la muestra debe efectuarse con ésta mantenida a temperatura ambiente y, a lo sumo, con la aireación adicional proporcionada por un compresor de aire; obviamente, cuanto menos tiempo transcurra entre la operación de toma de muestras y el análisis, mejor. De lo contrario, se ha observado que la *estructura flocular* es disgregada por efecto de los cambios de

temperatura que suponen la refrigeración, ocasionando problemas a nivel macroscópico tales como incrementos en la turbidez.

Precisamente, aquellos laboratorios que evaluaron de forma más negativa las características macroscópicas de la muestra, con excepción del participante 8, fueron el 4 y el 11, precisamente aquellos que más se retrasaron en el análisis de la misma (Tabla 1) y que conservaron la muestra en nevera.

En cuanto a *características microscópicas* se ha hallado mayor homogeneidad en los resultados (Tabla 5) que para el caso de los parámetros macroscópicos. La distribución en porcentajes de cada una de las categorías definidas podría resumirse como:

- *Forma*: 100% "irregular"
- *Tamaño*: 91% "medio", 9% "pequeño"
- *Estructura*: 36,5% "media", 63,5% "abierta"
- *Textura*: 82% "fuerte", 18% "débil"
- *Cobertura*: 73% "10-50%", 27% "<10%"
- *Fil. en flóculo*: 9% "<5 fil/flóc.", 36,5% "5-20 fil/flóc." y 54,5% ">20 fil/flóc."
- *Fil. en disolución*: 54,5% "baja" y 45,5% "alta"
- *Div. protozoos*: 82% ">7 sp.", 18% "4-7 sp."

Tomando como "categorías medias" las definidas con mayor frecuencia por el total de participantes, en la Tabla 16 quedan definidas las *características microscópicas* de la muestra:

Tabla 16. Características microscópicas "medias" en la muestra.

Características microscópicas	Categoría "media"
<i>Forma</i>	Irregular
<i>Tamaño</i>	Medio
<i>Estructura</i>	Abierta
<i>Textura</i>	Fuerte
<i>Cobertura</i>	10-50%
<i>Filamentos en flóculo</i>	> 20 filamentos/flóculo
<i>Filamentos en disolución</i>	Baja
<i>Diversidad de protozoos</i>	> 7 especies

Con relación al *tamaño flocular*, se ha tratado éste de un parámetro de gran convergencia por parte de la casi totalidad de los participantes, que ha definido como tamaño mayoritario la categoría "medio" (tamaño entre 150 y 500 μm).

Otras características con mayores dispersiones han sido "cobertura" y "filamentos en flóculo". Recordamos a los participantes que la "cobertura" valora si la unión de todos los flóculos presentes, visualizados con el ocular de 10X, cubre menos del 10 % de la superficie observada, del 10-50 % o más del 50 %. El procedimiento podría describirse de la siguiente manera: ¹reparto homogéneo de una gota de muestra sobre el portaobjetos, ²observación de varios campos seleccionados al azar, evitando zonas en las que la concentración de sólidos se perciba desequilibrada respecto al resto (p. ej. los bordes del cubreobjetos) y ³valoración del tipo de cobertura predominante en la preparación.

Con relación a "filamentos en flóculo", ha existido un reparto desigual entre las dos características que indican mayor concentración filamentosa: 5-20 filamentos/flóculo y > 20 filamentos/flóculo. Lo que sí parece probable es que la categoría seleccionada por el participante 6, < 5 filamentos/flóculo, tenga su explicación en un error, puesto que la "abundancia relativa" definida por este mismo participante en la hoja de trabajo específica para filamentos ha sido la de "abundantes" (categoría numérica 5).

La cuantificación de "filamentos en disolución" ha presentado una importante división de opiniones entre los participantes (de casi el 50%). Así, el 54,5% de los participantes ha considerado una concentración baja de filamentos en disolución, mientras que un 45,5% la ha considerado alta. Para dar solución a esta circunstancia, en el próximo ejercicio se proporcionará a los participantes un nuevo formato de recogida de datos en el que la presencia de filamentos en disolución se define de forma más precisa (con más categorías).

Respecto al apartado *diversidad de protozoos* se han detectado errores por parte de algunos participantes al no existir concordancia entre la categoría de abundancia de especies seleccionada y el número de especies registradas en la hoja de trabajo "evaluación de la microfauna".

En resumen, teniendo en cuenta el número de participantes "principiantes" que han intervenido en este ejercicio (36%), consideramos que los resultados han sido positivos aunque mejorables. En cualquier caso, si algún participante conserva alguna duda con relación al IF y a su aplicación, le rogamos se ponga en contacto con nosotros para tratar de solucionarla lo antes posible.

DENSIDAD Y DIVERSIDAD DE PROTOZOOS

En líneas generales, podría calificarse a ésta muestra como muy diversa y de densidad poblacional media. La mayoría de participantes, con excepción del 11 (Figura 9), ha detectado una alta diversidad de protozoos (superior a 10 especies). Suponemos que la observación tardía de la muestra junto con la falta de experiencia de nuestro participante 11 (principiante), explican este resultado. La densidad de protozoos ha sido especialmente homogénea, con excepción del participante 2 (Figura 5). Aunque los recuentos presentados en el informe de este participante son equilibrados, sospechamos de algún tipo de irregularidad en la operación de recuento. Rogamos a este participante se ponga en contacto con nosotros si necesita alguna recomendación relacionada con la preparación de la muestra para el recuento de microfauna.

La coincidencia en cuanto a grupo funcional dominante, los bacteriófagos sésiles, ha sido del 100%.

La identificación de especies dentro del grupo de las vorticelas ha sido compleja, por lo que el número de identificaciones ha estado en relación con la experiencia del analista. Consideramos que, en este sentido, también ha cobrado gran importancia el tiempo transcurrido entre la toma de muestras y la observación microscópica, pues el deterioro de la muestra es responsable de la alteración de estructuras, tamaños y formas corporales, esenciales en la determinación a nivel de especie. Sería conveniente resaltar en este apartado que, si bien puede ocurrir que el participante desconozca el nombre exacto de la especie, es necesario que, al menos, distinga a dicha especie de las demás (p. ej.: *Vorticella* 1, *Vorticella* 2...) y la cuantifique correctamente. Esta última apreciación, la cuantificación de individuos por especie, es de especial importancia en el cálculo del índice de Shannon, mientras que la identificación de especies es determinante en el cálculo del SBI.

A continuación se recoge una serie de notas sobre las características físicas de los organismos identificados por el total de participantes (Tablas 9-11). Algunos de los organismos que se describen se encuentran ilustrados en las Láminas 1-5 del Anexo fotográfico. La bibliografía seleccionada para la elaboración de estas notas así como algunas consideraciones acerca de la aplicación del SBI, se encuentran en:

- Foissner, W. y Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, *Ciliophora*) commonly used by hydrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* 35, 375-482.
- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Wat. Res.* 28, 1, 67-75.

- Serrano, S., Pérez-Uz, B., Arregui, L. y Calvo, P. (2004). Claves de identificación de protistas en estaciones depuradoras de fangos activos. Dpto. de Microbiología III. Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid. Ponencia en el curso: Protozoos en el fango activado. Fundación Emasesa, marzo de 2004.
- Streble, H. y Krauter, D. (1987). *Atlas de los microorganismos de agua dulce. La vida en una gota de agua*. Ed. Omega, Barcelona.
- Warren, A. (1986). A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool)*. 50, 1, 1-57.

Ciliados carnívoros nadadores

Litonotus sp.: cuerpo fusiforme y aplanado lateralmente, citostoma alargado situado en la parte anterior o lateralmente, ciliación oral bien diferenciada (melena de cilios). Dos macronúcleos y un micronúcleo central. Tamaño en relación con la especie, comprendido entre 100-200 μm .

Ciliados sésiles: bacteriófagos y carnívoros

Los organismos *Vorticella convallaria* y *Vorticella microstoma* consideramos que no entrañan dificultades en la identificación por tratarse de organismos más ampliamente distribuidos en sistemas de fangos activos y por esta razón no se incluye aquí la descripción física de ellos.

- *Vorticella campanula*: zooide de 50-157 μm de largo (media 68 μm) y 35-99 μm de ancho (media 58 μm) con forma de campana invertida; constricción bajo el labio peristomial; vacuola contráctil situada en el primer tercio superior de la célula; macronúcleo en forma de "J" y situado de forma longitudinal respecto al cuerpo; citoplasma con numerosos gránulos refringentes; pedúnculo estriado y largo (incluso >500 μm).

- *Vorticella vernalis*: zooide de 50 μm de largo y 30 μm de ancho, elongado y con forma de trompeta; labio peristomial bien desarrollado (35 μm) sin constricción. Dos vacuolas contráctiles situadas en el primer tercio del cuerpo; macronúcleo alargado, en forma de "C", dispuesto de forma longitudinal respecto al cuerpo. Pedúnculo de 350 μm de longitud.

- Complejo *Vorticella aquadulcis*: organismos de dimensiones aproximadas de 15-35 μm de ancho y 25-55 μm de largo. Cuerpo piriforme dotado de labio peristomial de menor diámetro que la anchura máxima de la célula. Macronúcleo en "C" situado transversalmente al cuerpo y rodeando la

cavidad peristomática. Vacuola contráctil en la zona anterior y próxima al infundíbulo. Estriación transversal aparente de borde convexo.

Especies incluidas en este complejo:

- *Vorticella striata*: cuerpo celular de 20-50 μm (valor medio 35 μm) de largo y 15-32 μm de ancho. Constricción bajo el labio peristomial de aproximadamente 18 μm ; disco convexo. Vacuola contráctil situada justo debajo del peristoma; macronúcleo en forma de "C" situado transversalmente en el centro del cuerpo. Pedúnculo de anchura media 3 μm y longitud media 100 μm .

- *Vorticella banatica*: zooide de 60-80 μm de largo y 50 μm de ancho con forma de campana invertida con un labio peristomial bien desarrollado de 55 μm . Vacuola contráctil situada justo debajo del centro del zooide; macronúcleo en forma de "J". Pedúnculo delgado de más de 80 μm de largo.

- Complejo *Vorticella infusionum*: zooide de 35-60 μm de largo por 18-30 μm de ancho, constricción bajo el labio peristomial (15-20 μm). Vacuola contráctil situada justo debajo del peristoma. Macronúcleo en forma de "C", situado transversalmente en el centro del cuerpo.

- *Epistylis plicatilis*: peritrico colonial de ramificación dicotómica, pedúnculo no contráctil y labio peristomial patente. Pedúnculo estriado longitudinalmente. Zooide con forma de trompeta, unido al pedúnculo por la zona más estrecha. Labio peristomial de anchura superior a la del cuerpo. Macronúcleo en "C". Vacuola contráctil próxima al peristoma. Estriación transversal del cuerpo.

- *Carchesium* sp.: peritrico colonial de pedúnculo contráctil y mionema discontinuo que permite la contracción independiente de los individuos de la colonia. Las colonias pueden alcanzar dimensiones superiores al milímetro. Zooides de dimensiones comprendidas entre 80-140 μm , con forma de campana invertida (similar a *V. convallaria*) y amplio peristoma. Macronúcleo en "C". Película no estriada.

- *Opercularia microdiscum*: peritrico colonial de pedúnculo no contráctil y con opérculo (ausencia de labio peristomial). Zooides de proporciones 70-90 μm de largo. El cuerpo celular de esta especie es en forma de barril con una apertura ancha. El disco peristomático, de anchura aproximada 1/5 de la anchura del cuerpo, se inserta mediante una corta estructura. Macronúcleo situado en la zona anterior del cuerpo, alrededor de la faringe. Película estriada. Pedúnculo estriado longitudinalmente pero no segmentado.

- *Tokophrya* sp. Suctor de forma corporal variable, a menudo piramidal, en el que el pedúnculo se inserta en el extremo más delgado del cuerpo. Tentáculos agrupados en 2 o 4 haces en la parte anterior. Macronúcleo más o menos esférico. Vacuola contráctil en zona anterior de la célula.

- *Podophrya* sp. Suctor de cuerpo celular esférico sobre el que se disponen los tentáculos uniformemente y por toda la superficie del cuerpo. Macronúcleo esférico. Vacuola contráctil en la zona anterior del cuerpo.

Bacteriófagos nadadores:

Dentro de este grupo han sido identificados los ciliados nadadores *Uronema* sp. y *Paramecium* sp.

Buena parte de los participantes mencionan a un nadador de forma esférica y de desplazamiento rápido por el licor mezcla sin identificar. Este holotrico desconocido, por la descripción y el material fotográfico aportado por algunos laboratorios, podría tratarse de *Holophrya* sp. Ciliado holotrico de cuerpo esférico de proporciones 80-180 μm (dependiendo de la especie). Extremo anterior en forma de "foseta" donde se constituye el orificio oral. Macronúcleo redondo/elíptico (depende de la especie) y en posición central.

Bacteriófagos reptantes:

Han sido identificados: *Aspidisca* sp. (cicada según algunos participantes) y *Acinertia uncinata*.

Hipotrico desconocido: ninguno de los participantes ha podido identificar al bacteriófago reptante que buena parte de los laboratorios ha recogido.

- *Stylonichia* sp.: Ciliado aplanado, ovalado y alargado. Tamaño dependiente de la especie, varía entre 100-150 μm . ZAM (zona adoral de membranelas) patente. Dos macronúcleos y una vacuola contráctil en posición media. 3 cirros caudales en la zona posterior del cuerpo.

Grandes flagelados:

- *Euglena* sp.: Célula ovoide o alargada, cilíndrica, aplastada o con forma helicoidal y extremo distal apuntado o redondeado. Uno o más plastos verdes. Normalmente, con un flagelo. Movimiento por rotación helicoidal de la célula o deslizamiento sobre superficies. Presencia de una estructura coloreada en rojo (β -carotenoides) llamada estigma. Vacuola contráctil.

Pequeños flagelados:

La presencia de pequeños flagelados ha sido detectada por parte de algunos participantes, aunque sólo tres laboratorios ha contabilizado más de 10 pequeños flagelados en la diagonal de la cámara de recuento.

Metazoos:

Nematodos y Rotíferos.

ÍNDICE DE MADONI Y SHANNON

La mayoría de los participantes, un 64%, ha definido la Clase I del Método Madoni, mientras que el 36% restante ha definido la Clase II (Figura 8).

A pesar de la gran concordancia entre los resultados obtenidos, sería conveniente comentar un error detectado en el cálculo del SBI por parte de algunos laboratorios. Aunque, finalmente, estos errores no han repercutido sobre la Clase de fango establecida, sí han respondido a ligeros cambios sobre el valor numérico del SBI. Este error se refiere al grupo funcional dominante con el que "ingresar" en la tabla de doble entrada. Si bien en la totalidad de los resultados aportados por los participantes el grupo funcional mayoritario establecido es el de los bacteriófagos sésiles (con un porcentaje superior al 80%), entendiéndose que el grupo funcional dominante es el de los ciliados sésiles, algunos participantes han seleccionado como grupo mayoritario el de los "ciliados reptantes+sésiles+y/o tecamebas".

En cuanto a las diferencias establecidas entre las plantillas de recogida de datos de los participantes que determinaron un fango de Clase I o de Clase II, éstas podrían resumirse como dos situaciones distintas: ¹participantes que contabilizaron >10 pequeños flagelados en la diagonal de la cámara de Fuchs-Rosenthal (participantes 4, 5 y 6) y ²participantes que identificaron una variedad de especies de entre 5-7 (participante 11). En ambos casos, la calidad biológica de la muestra fue estimada como Clase II.

En cuanto al Índice de Shannon, los resultados obtenidos por los distintos participantes han resultado poco dispersos e indicativos de una muestra de diversidad importante (Figura 6). En la determinación de este parámetro influye claramente el adiestramiento del participante para distinguir especies y cuantificarlas adecuadamente.

IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES BACTERIANAS

En la Tabla 17 se recogen las características morfológicas y reactivas que describen a los organismos filamentosos más frecuentes en la muestra, según la evaluación de los distintos participantes (Jenkins *et al.*, 1993). La mayoría de estos organismos está recogida en el Anexo fotográfico (Láminas 7-8).

Tabla 17. Características morfológicas y reacción a tinciones de los filamentos más abundantes en la muestra según criterio de los distintos participantes (Jenkins *et al.*, 1993).

Características	Tipo 1701	Tipo 1702	Tipo 1851	H. hydrossis
Tamaño (μm): \emptyset	0,7-1/ 20-100	0,6-0,7/	0,8-1,0/ 100-	0,5/
tricoma / longitud tricoma		20-80	300	10-100
Gram	Negativo	Negativo	ligeram. +	Negativo
Neisser	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
PHB	PHB	Negativo	Negativo	Negativo
	vaina, septos celulares	vaina, septos no	vaina, cto epifítico,	vaina, septos no visibles, puede
Otros	visibles con constricciones, crecimiento epifítico	visibles, sin crecimiento epifítico	septos difíc. observables, filamentos en "manojos"	presentar cto epifítico, "agujas que irradian del flóculo"

Una proporción importante de los participantes ha identificado al organismo Tipo 1702 entre los más abundantes y en algunas ocasiones de forma conjunta con *Haliscomenobacter hydrossis* (Tabla 8). Esta última bacteria ha sido considerada, en algunos casos, como único organismo dominante o como filamento secundario (la mayoría de las veces junto a filamentos como el Tipo 1863).

Con relación a la morfología y reactividad a tinciones de estos dos organismos, el Tipo 1702 y *H. hydrossis*, sería conveniente resaltar las escasas diferencias existentes. Una de dichas diferencias reside en el grosor del filamento, superior en el caso del Tipo 1702 que en el de *H. hydrossis*. Sin embargo, para una observación con microscopía óptica, consideramos que dicha diferencia, de aproximadamente 0,2 μm , puede pasar desapercibida. Aunque la bibliografía describe a ambos organismos prácticamente de la misma manera, tanto en su disposición en el flóculo como en la morfología del tricoma, nuestra experiencia nos indica que *H. hydrossis* suele presentar el aspecto de "agujas que

irradian de los flóculos" y suele ser también típico en estos filamentos la presencia de "queiebros" en el tricoma (puntos por los que el filamento se dobla).

En cuanto a la ecología de *H. hydrossis*, la mayoría de autores coincide en su asociación con bajas concentraciones de oxígeno disuelto y bajas cargas másicas (Jenkins *et al.*, 1993; Seviour y Blackall, 1999). Sin embargo, sobre la ecología y fisiología del Tipo 1702 apenas nada se sabe. Algunos autores como Seviour y Blackall (1999) lo describen como un filamento de rara ocurrencia en plantas, del que poco se conoce su ecología y parámetros operacionales que favorecen su crecimiento, y de fisiología desconocida.

El resto de organismos identificados como dominantes, el Tipo 1701 y el Tipo 1851, se distingue de los dos anteriores en la presencia de septos celulares visibles, en las proporciones del tricoma y, en el caso del Tipo 1701, en la presencia de gránulos de PHB. Una importante proporción de participantes identificó al Tipo 1701 como uno de los organismos secundarios (Lámina 8, Figura e) o lo incluyó en el grupo de filamentos de observación incidental o poco frecuente. El Tipo 1851 tan sólo fue identificado por uno de los participantes.

Con relación a los filamentos en disolución, buena parte de los participantes identificó al Tipo 1863 como organismo secundario y lo asoció a la presencia de turbidez observada en el clarificado (Lámina 8, Figuras c-d).

6. CONSIDERACIONES PARA LOS PRÓXIMOS EJERCICIOS INTERLABORATORIOS

En vistas a los resultados obtenidos en algunos de los apartados aquí presentados, nos gustaría hacer saber a los participantes lo siguiente:

- Esperamos la cumplimentación del apartado "otros procedimientos de cuantificación de organismos filamentosos" en el próximo ejercicio. Dejamos a elección del participante el método de cuantificación de los dos propuestos.

- Igualmente, esperamos que los participantes aporten los resultados requeridos en el apartado "otros parámetros de interés: SSLM, SSVLM, V30 e IVF".

- En el próximo ejercicio, en el que podremos conocer de forma más precisa la evolución de cada uno de los participantes, esperamos extraer conclusiones sobre las características macroscópicas del IF "turbidez" y "flóculos en suspensión". Si fuera necesario, en la reunión final correspondiente a este circuito, estos conceptos serán debatidos y ensayados en laboratorio.

- Para el próximo ejercicio interlaboratorio, que se realizará el día 11 de mayo, proporcionaremos a los participantes nuevos formatos de recogida de datos en los que se han producido una serie de modificaciones. Consideramos que estas modificaciones no entrañan ninguna dificultad añadida, pero en cualquier caso nos ponemos a vuestra disposición para cualquier consulta que queráis realizar. También estamos haciendo cambios en nuestro "Manual de trabajo", los cuales serán comunicados en la mencionada reunión final.

En cualquier caso, si tenéis sugerencias sobre el IF (metodología, aplicabilidad, etc.) o cualquiera de las hojas de trabajo, por favor, hacedlas.

Por último, comunicamos que la fecha prevista para la reunión final es Septiembre de 2004. Nuestra intención es organizar una jornada lo más completa posible y abordar, entre otros, temas tan interesantes como "el tratamiento y conservación de muestras", que como hemos comprobado en este ejercicio, repercuten decisivamente en el análisis de una muestra. Si hubieran cambios en la planificación de este evento, se os comunicará.

7. AGRADECIMIENTOS

Queremos mostrar nuestro agradecimiento a nuestro colaborador, D. Andrés Zornoza (UTE AVSA-EGEVASA), por su participación y por el valioso material fotográfico aportado.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Foissner, W. y Berger, H. (1996). A user-friendly guide to the ciliates (Protozoa, *Ciliophora*) commonly used by hidrobiologists as bioindicators in rivers, lakes, and waste waters, with notes on their ecology. *Freshwater Biology* **35**, 375-482.
- Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G. T. (1993). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. WRC, Pretoria y USEPA, Cincinnati.
- Jiménez, C., Fernández, N., de la Horra, J. M., Rodríguez, E., Isac, L., Salas, D. y Gómez, E. (2001). Sistema rápido de estimación de los rendimientos en depuración de una E.D.A.R. en función de las características macroscópicas y microscópicas del fango activado. *Tecnología del Agua* **216**, 40-44.
- Madoni, P. (1994). A sludge biotic index (SBI) for the evaluation of the biological performance of activated sludge plants based on the microfauna analysis. *Wat. Res.* **28**, 1, 67-75.
- Seviour, R. J. y Blackall, L. L. (1999). *The microbiology of activated sludge*. Kluwer Academic Publishers.
- Streble, H. y Krauter, D. (1987). *Atlas de los microorganismos de agua dulce. La vida en una gota de agua*. Ed. Omega, Barcelona.
- Warren, A. (1986). A revision of the genus *Vorticella* (Ciliophora: Peritrichida). *Bull. Br. Mus. Nat. Hist. (Zool)*. **50**, 1, 1-57.
- Web recomendada sobre índices de diversidad:
<http://www.mdsg.umd.edu/Education/biofilm/diverse.htm>