

EJERCICIOS INTERLABORATORIOS DE FANGOS ACTIVOS Y PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DE AGUAS TRATADAS

INTRODUCCIÓN

Organismos de acreditación y certificación, tanto en el ámbito nacional como internacional, recomiendan la participación de los laboratorios en sesiones de ejercicios interlaboratorios, ya que constituyen un medio independiente por el cual se puede **evaluar objetivamente y demostrar la fiabilidad y precisión** de los datos obtenidos (Pullés *et al.*, 2006, ENAC, 2008).

La participación rutinaria en estos ejercicios de intercomparación permite a los participantes obtener un control de calidad externo, muy valorado por los auditores y reevaluar sus propios métodos. La posición de valoración para cada participante, en un ejercicio interlaboratorio, **genera confianza y fiabilidad de los resultados** frente a clientes internos y externos de la entidad que participa, constituyendo un importante elemento de ayuda a la mejora de la calidad del participante.

Los ejercicios interlaboratorio de Fangos activos, pueden ser calificados tanto como **ensayos de aptitud** (asesoramiento externo de la competencia de la técnica de cada participante, Sagrado, S. *et al.*, 2005), **como ensayos colaborativos** (Permiten ajustar un método de referencia en el campo de la microbiología, Sagrado, S. *et al.*, 2005).

Es por todo esto por lo que GBS crea anualmente una convocatoria de ejercicios interlaboratorios que se definen como una herramienta básica, sobre todo en análisis de tipo microbiológico, para unificar criterios debido a la alta densidad de microorganismos por mililitro y a la gran dispersión de valores que pueden ocasionar pequeñas diferencias en la metodología de análisis de los fangos activos. Así pues, estos ejercicios ofrecen la oportunidad de comparar los resultados y métodos con los demás laboratorios participantes, con objeto de detectar errores sistemáticos y eliminar este tipo de desviaciones.

DESCRIPCIÓN DE LA PLANIFICACIÓN DEL TRABAJO.

Pasamos ahora a definir cada una de las etapas que forman parte del desarrollo de estos ejercicios interlaboratorios.

1.- Divulgación del ejercicio

Estos ejercicios se desarrollan en convocatoria anual, coincidiendo con el año natural. Cada convocatoria consta de dos rondas, febrero y mayo generalmente. A finales del mes de enero se realiza el envío del calendario en el que se disponen las fechas relevantes.

Previo a la fecha de cada uno de las rondas se envía una notificación informativa que incluye la dirección y fecha de recogida de las muestras, material solicitado, persona de contacto y fechas importantes.

En el mismo momento de envío del calendario anual, cada participante recibe su código numérico que le identifica aportando la confidencialidad requerida en estas formas de trabajo. En ningún momento se facilitará información del resto de laboratorios que no sean propios.


A continuación se muestra el calendario de eventos genérico.

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
21	22	23	24	25	26	27
28	1	2	3	4	5	6
7	8	9	10	11	12	13

Fechas fijadas para el primer ejercicio interlaboratorio de febrero - marzo

LUNES	MARTES	MIÉRCOLES	JUEVES	VIERNES	SÁBADO	DOMINGO
23	24	25	26	27	28	29
30	31	1	2	3	4	5
6	7	8	9	10	11	12

Fechas fijadas para el segundo ejercicio interlaboratorio de mayo- junio

Toma de muestras  Envío de muestras a todos los participantes

 Realización de los ensayos  Fecha límite para entrega de los resultados.

2.- Recepción de solicitudes de participación.

Desde el departamento de administración de GBS y el personal responsable del correcto desarrollo de los ejercicios interlaboratorios, a través de su dirección de correo electrónico

interlaboratorios@asociaciongbs.com, se responden y hacen frente a todas las consultas y solicitudes de participación recibidas.

3.- Selección de la muestra a analizar. Envío de la muestra y documentación.

GBS realiza un estudio previo de las muestras de los reactores biológicos, de varias depuradoras de aguas residuales urbanas o con poco aporte industrial, seleccionando aquella más estable y con mayor interés para la intercomparativa. En todo momento se salvaguarda el anonimato del origen de la muestra.

Cada ronda cuenta con varias muestras para la determinación de determinados parámetros y aspectos a cada una de ellas tal y como se determina en la tabla adjunta.

	Muestra	Analítica
Muestra de EDAR Urbana	Fango activo de EDAR Urbana	Análisis microbiológico completo, determinando Índice de fango, V30, MLSS y MLVSS, valoración de filamentos y protistas.
	Agua tratada en EDAR Urbana	Determinación físico-química de la calidad del agua
Muestra de Edar Industrial	Fango activo de EDAR Industrial	Valoración de bacterias filamentosas y estado del flóculo

La toma de muestras es realizada por GBS o algunos de sus colaboradores, se obtienen unos 50 litros de fango activo al final del proceso biológico, en el momento de máxima agitación y como paso previo a la decantación en el caso de fango activo de EDAR urbana. El mismo volumen es tomado de agua tratada y en el caso de muestra de fango activo de Edar de origen industrial se tomará un volumen tal que permita la distribución de unos 50 ml a cada uno de los participantes.

Estas muestras son trasladadas a las instalaciones de GBS, donde se llevará a cabo la homogenización y división de las mismas en alícuotas de los siguientes volúmenes:

Muestra	Volumen (ml)
Fango activo de EDAR Urbana	1500
Agua tratada en Edar Urbana	1000
Fango activo de EDAR Industrial	50



Figura 1. Muestras preparadas para ser enviadas. Fotografía realizada por Raquel Liébana. UCM.

Los participantes envían a las instalaciones de GBS los sistemas de contención de muestras refrigeradas, incluyendo: frasco de plástico de 2 L de cierre hermético vacío, placas refrigerantes y material de relleno de la muestra para evitar movimientos bruscos. Dicho envío debe hacerse en la modalidad de “envío con retorno”, de modo que en el mismo momento en el que la nevera llega a GBS, es completada con las muestras anteriormente definidas y de nuevo entregada a la misma mensajería de modo que se garantice la entrega en destino, como muy tarde, al siguiente día de la toma de muestra, evitando así alteraciones de las misma.

Todas las muestras van contenidas en frascos de plásticos de 2 litros de capacidad y cierre hermético en el caso de fango activo y agua tratada de la Edar Urbana, y en frascos de iguales características pero mucho menor volumen para la muestra de fango activo de la Edar

industrial. En cualquier caso todas las muestras ocuparán aproximadamente dos tercios de la capacidad del frasco, de forma que quede una cámara de aire a fin de evitar la anoxia durante el transporte de las muestras. Igualmente todos los frascos estarán rotuladas con el código de participante, el tipo de muestra y la fecha de envasado de la misma.



Figura 2. Momento del proceso de distribución de muestras. Fotografía realizada por Raquel Liébana. UCM.

De forma simultánea a la distribución de las muestras y ya sea aprovechando este mismo envío o bien por correo electrónico, cada participante recibe la documentación necesaria para el desarrollo de las analíticas, documentación que está en continua revisión y actualización.

Entre estos documentos destacan:

- Entrega protocolo estandarizado: validado por GBS desde 2004 y actualizado anualmente. Pilar básico para iniciarse y profundizar en el estudio de análisis de fangos activos
- Formatos de recogida de datos: con cálculos automáticos

ESTUDIO DE LA MICROFAUNA						Fecha		MUESTRA		Código de muestra		
GRUPO	ESP.	Clas.	Pres.	Cont.	Notas	Pres.	Cont.	Pres.	Cont.	Pres.	Cont.	
A	Bacterias	Coliformos										
		Coliformos totales										
		Coliformos fecales										
		Coliformos aerobios										
		Coliformos anaerobios										
	Algas	Algas verdes										
		Algas azules										
		Algas rojas										
		Algas pardas										
		Algas diatomeas										
C	Protozoos	Amoebas										
		Paramecios										
		Flagelados										
		Ciliados										
		Rotíferos										
	Materia orgánica	Materia orgánica total										
		Materia orgánica disuelta										
		Materia orgánica particulada										
		Materia orgánica floculada										
		Materia orgánica sedimentada										

FECHA DE ENVÍO	FECHA DE RECEPCIÓN
LABORATORIO	LABORATORIO
OPERARIO	OPERARIO

INSTRUCCIONES:
 En cada orden: 1) Clasificación de los organismos encontrados según el sistema de clasificación de la OMA.
 2) Presencia o ausencia de los organismos.
 3) Cantidad de organismos.
 NOTA: Se indican algunas especies de interés en la tabla adjunta en el folio 2.

INDICADOR DE RESULTADO	DESCRIPCIÓN
1	MUCHO
2	MODERADO
3	POCO
4	NULO

INDICADOR DE RESULTADO EN EL ANÁLISIS	DESCRIPCIÓN
1	MUCHO
2	MODERADO
3	POCO
4	NULO

Fichas de trabajo para la valoración de protistas.

El personal técnico de GBS, durante el mismo día de distribución de la muestra realiza un estudio de comprobación de la estabilidad del fango activo enviado determinando los posibles efectos sobre los resultados finales. De esta forma se establece una comparativa entre el día del envío y el día del análisis.

4.- Realización de las determinaciones por parte del participante.

Una vez recibidas las muestras el participante debe realizar la determinación de las mismas y rellenar las fichas de recogida de datos enviadas para tal fin, y enviarlas a GBS debidamente cumplimentadas.

Los requisitos necesarios para la realización de estas analíticas será disponer de un microscopio con objetivos de 100X 200X, 400X y 1000X así como del material para su uso (portaobjetos, cubreobjetos), probeta de 100 mL y reactivos y material necesario para las tinciones Neisser, Gram, test de azufre y PHB.

Entre las determinaciones que debe realizar:

- Determinación del Índice de fango, para lo cual realizará una valoración de las características macroscópica y microscópicas del fango activo. Para la determinación de las características macroscópicas, se realiza el ensayo de V30, calificando entre otras la sedimentabilidad del fango, la turbidez del clarificado, la presencia de flóculos en suspensión, e incluso el olor del mismo. La valoración microscópica del fango se realizará tras visualización al microscopio, valorando no solo la estructura flocular del mismo, (tamaño, compactación, textura, etc) sino también la diversidad de protistas y la abundancia de bacterias filamentosas. Adicionalmente se contrasta V3., MLSS y MLVSS.
- Valoración de bacterias filamentosas. En esta apartado el participante deberá identificar los bacterias presentes en la muestra, para lo cual podrá apoyarse en las visualizaciones *In vivo* y en tinciones. Igualmente deberá cuantificar los filamentos presentes en la muestra mediante dos técnicas distintas, de un lado mediante la abundancia relativa (contando los filamentos por flóculos) y según el procedimiento desarrollado por el profesor Humbert Salvadó. Se realizarán otras valoraciones complementarias tales como el efecto de los filamentos en el flóculo y la ecología de las especies presentes.
- Valoración de la comunidad de protistas. Al igual que en el caso de las bacterias filamentosas el participante debe identificar las especies protozoarias presentes y establecer una densidad de protozoos presentes en el ecosistema. Una vez obtenida dicha información, se podrá definir algunas características que pueden aportar mucha

conocimientos sobre ecosistema en el que trabajamos. (grupo dominante de protistas, reparto porcentual de grupos funcionales, índice de Shannon, Índice de Madoni,...)

- Valoración general de la calidad del fango. Finalmente y la vista de las observaciones realizadas en los anteriores apartados se podrá establecer una valoración general de la calidad del fango.
- Determinación físico – química de la calidad del agua tratada. En este caso se realizarán las determinaciones de sólidos en suspensión (SS), demanda química de oxígeno (DQO), demanda bioquímica de oxígeno a los cinco días (DBO_5), nitrógeno Kjeldahl (N_K) y fósforo total (P_T). En este caso cada participante actuará en base a los métodos establecidos en su laboratorio, si bien es necesario definir esta metodología en los documentos de recogida de información.

El análisis de las características macroscópicas y microscópicas del fango y el análisis de protozoos, deberán realizarse inmediatamente a la recepción de la muestra y a lo sumo al siguiente día del envasado de la misma. El análisis de filamentos debe realizarse también en ese plazo, pero puede demorarse un par de días siempre que se fijen frotis de forma adecuada. Deberá indicarse la fecha de análisis de cada bloque. Se recomienda que, una vez recibido el bote con la alícuota de fango activo a analizar, se destape y someta a agitación suave durante algunos minutos. En cualquier caso, se destapará el bote y homogeneizará suavemente antes de cada uno de los análisis propuestos, evitando derrames y agitaciones bruscas que puedan alterar o destruir la representatividad de la muestra, la estructura y cohesión flocular.

5.- Tratamiento de datos y realización del informe.

Desde la recepción de la muestra, el participante dispone de un periodo de unos 15 días aproximadamente para el envío de sus resultados a GBS, quien realizará una revisión provisional de los mismos, solicitando a cada participante los datos y aclaraciones que se

estimen oportunas. Con toda esta información se creará una la tabla provisional de datos similar a la que se muestra a continuación, y que será enviada a la totalidad de los participantes.

MUESTREO	12/11/02				
PARTICIPANTE	1	2	3	4	5
MACROSCOPIA	21	25,5	26	26	25,5
MICROSCOPIA	43	43	43	50	43
INDICE DE FILAMENTOS	64	68,5	69	75,5	68,5
CATEGORIA DE FILAMENTOS	4	4,5	4	4	4
FILAMENTO DOMINANTE	MICROTHRIX	MICROTHRIX	MICOTHRIX	MICROTHRIX	MICROTHRIX/1701
FILAMENTO SECUNDARIO	1701/NOSTOCIDA	1701/NOSTOCD LIM II	1701/NOSTOC III	021N	NOSTOCOID/HALISCOM
EFEECTO FLOCULO	DISGREGACION	DISGREGACION		DISGREGACION	
OTROS FILAMENTOS	NOCARDIA/HALISCOM		HALISCOMENOB		021N
REL FIL (IRF)	1,32	1,87	1,55	1,68	2
m/ml FILAMENTOS	770,24				
DENSIDAD (org/l) * EXP 6	2,86	4,38	3,23	3,04	4,6
INDICE DE SHANÓN	2,83	2,79	2,65	2,46	2,56
INDICE DE MADONI	10	10	10	10	8
CLASE MADONI	1	1	1	1	1
NUMERO DE ESPECIES	12	13	12	10	13
GRUPO DOMINANTE	SESIL/REPTANTE	SESIL/REPTANTE	SESIL/REPTANTE	SESIL/REPTANTE	SESIL/REPTANTE
OBSERVACIONES					

Tabla de recogida de resultados para un interlaboratorio

Como paso previo al tratamiento de los datos obtenidos debemos tener en cuenta varias ideas generales:

A. La incertidumbre de medida es un parámetro asociado a la medición, que caracteriza la dispersión de los valores que pueden atribuirse razonablemente al mesurando (ENAC, 1998). Para fangos activos, la dispersión de los datos es muy elevada y el esfuerzo de sistematización y contraste debe ser muy alto.

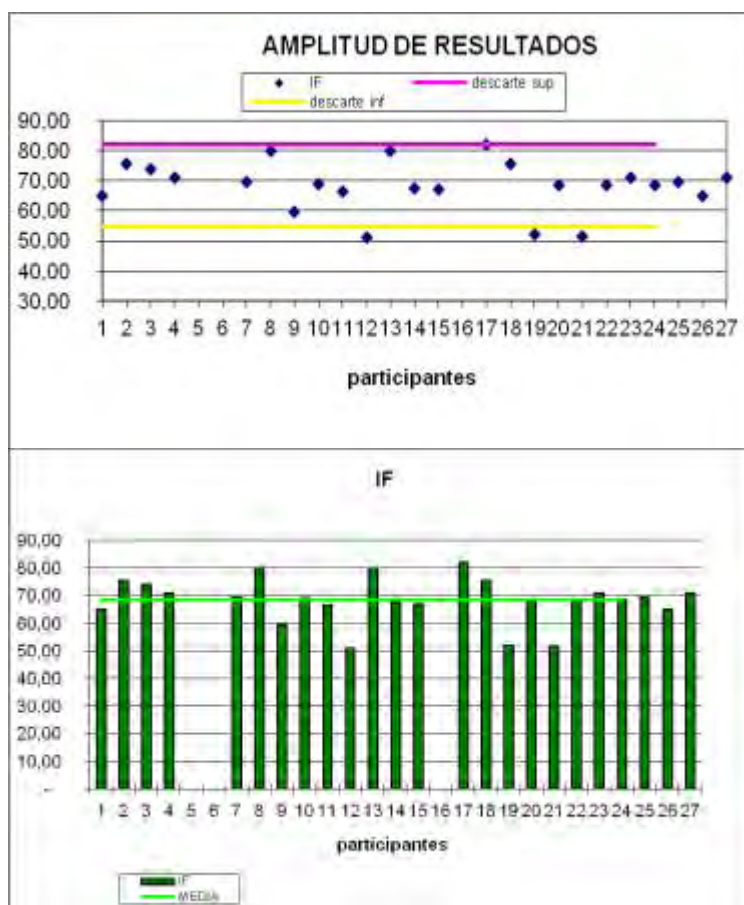
B. Se deben definir los mesurandos, entendidos éstos como las magnitudes particulares objeto de una medición (ENAC, 1988). En el caso particular de los fangos activos, podría estar representado por el IF, Índice de Madoni, Identificación de filamentos....

Con los resultados de los laboratorios se procederá a la conversión logarítmica (evaluación de la microfauna) y al tratamiento técnico y estadístico de los mismos. En cada ejercicio y para cada parámetro se calculará la media, desviación típica, coeficiente de variación e intervalo global de cada uno de los índices de bio calidad implicados. Es conveniente valorar también los porcentajes de la agrupación de los resultados, el valor máximo y mínimo de fluctuación de los datos y la medida de tendencia central o moda (Pola, 1993).

Las conceptos empleados son:

- Cálculo de la media: $X = \frac{\sum xi}{n}$
- Desviación típica: $S = \sqrt{\frac{(\sum xi-x)^2}{n-1}}$
- Coeficiente de variación: $CV=100\frac{S}{X}$

A modo de ejemplo se muestra los datos y gráficos obtenidos para la determinación del Índice de fango.



IF	
1	65,0
2	75,5
3	74,0
4	71,0
7	69,5
8	80,0
9	59,5
10	69,0
11	66,5
12	51,0
13	80,0
14	67,5
15	67,0
17	82,0
18	75,5
19	52,0
20	68,5
21	51,5
22	68,5
23	71,0
24	68,5
25	69,5
26	65,0
27	71,0
MEDIA	68,3
VARIANZA	68,5

Además de realizar el tratamiento estadístico de los datos, que se incluyen el en capítulo nº 4 del informe, este consta de bastante más documentación, reportaje fotográfico e estudio

respirométrico de la muestra de fango activo, lo que permite establecer una valoración global del sistema, y establecer diversas observaciones para el control y mantenimiento del proceso de depuración. El índice general del informe consta de los siguientes apartados:

1. Introducción
2. Participantes
3. Resultados
4. Análisis de datos:
 - a. Caracterización macroscópica y microscópica del fango activado (IF)
 - b. Identificación y cuantificación de bacterias filamentosas.
 - c. Caracterización de la microfauna
 - d. Otros parámetros de interés
5. Conclusiones:
 - a. Generales
 - b. Valoración de la muestra
6. Consideraciones para los próximos ejercicios interlaboratorios.
7. Agradecimientos
8. Bibliografía.

Anexo I: Reportaje fotográfico: Macroscopia y Microscopía – Bacterias filamentosas – Protistas y metazoos.

Anexos: Colaboraciones especiales de carácter no obligatorio:

Anexo II: Estudio respirométrico de la muestra. Ensayos realizados por Surcis S.L.

Anexo III: Viabilidad celular de la muestra industrial. Fotografías realizadas por el profesor D. José Luís Alonso. Universidad Politécnica de Valencia.

Anexo IV. Parámetros físico – químicos del agua tratada.

Anexo V: Estudio biológico. Realizado por D^a Lucía Arregui, D^a Raquel Liébana, D^a Blanca Pérez –Uz y D^a Susana Serrano, de la Universidad Complutense de Madrid.

Anexo VI: Valoración ecológica de la muestra. Realizado por el profesor D. Humbert Salvado. Universidad de Barcelona

Una vez concluido la realización de ambos informes, GBS convoca y organiza una reunión final normalmente de frecuencia anual, en las que se ofrece un interesante foro de encuentro de profesionales del sector, en el que se debaten las particularidades de las muestras y las incidencias del análisis. Generalmente, se propone la sistemática abierta a comentarios y posibles modificaciones que puedan proponer los participantes. Dado el avance de las tecnologías que posibilitan de una forma más dinámicas las comunicaciones, GBS ha decidido como novedad establecer un foro de debate en el que se establezca un dialogo entre los participantes aportando de este modo sus experiencias e inquietudes. Es aquí donde se plantean las dificultades encontradas en la identificación y recuento de organismos y en general, de cada bloque analítico. Se aclaran dudas, se pueden proponer alternativas complementarias a técnicas usadas, se estudian las observaciones planteadas por los participantes (anónimos) en cada análisis, etc. En definitiva, se gesta la unificación de criterios de los profesionales del análisis aplicado en este tipo de muestras.

Al concluir el circuito interlaboratorio, cada participante recibirá un certificado que acredite su participación en el circuito. No es competencia del organismo organizador del ejercicio de intercomparación, el estudio individual de cada participante y mucho menos entrar en valoraciones concretas y recomendaciones. La participación en este tipo de ejercicios debe implicar una autoevaluación crítica y personal de cada laboratorio.