

RESULTADOS DEL ENSAYO
INTERLABORATORIO PARA
FANGOS ACTIVOS (25/2/03)

ORGANIZADO POR GBS

Grupo Bioindicación Sevilla

www.grupobioindicaciónsevilla.com

ÍNDICE

- ❑ Introducción
- ❑ Participantes
- ❑ Resultados
- ❑ Análisis de datos
 - Caracterización macroscópica y microscópica del fango activo (IF)
 - Identificación y cuantificación de bacterias filamentosas
 - Caracterización protozoaria
- ❑ Conclusiones
 - Valoración de la muestra
 - Generales

- ❑ Anexo fotográfico (Se adjunta en un documento aparte para evitar problemas de abertura debido al tamaño excesivo del informe)

INTRODUCCIÓN

Con el objetivo de unificar criterios GBS organiza ejercicios interlaboratorio de fango activo con muestras de distintas características.

Estos ejercicios de intercomparación entre laboratorios son una herramienta básica, sobretudo 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.

El ensayo del 25 de Febrero de 2003 se realizó sobre una muestra puntual de Fango Activo, distribuida por GBS desde Sevilla 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.

PARÁMETROS ESTADÍSTICOS UTILIZADOS

El cálculo de la media nos informa sobre el valor más probable de la variable a estudio. Se ve fuertemente afectada por los valores extremos de la población.

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

Los intervalos de confianza indican los valores aceptables para que los resultados se encuentren en torno a la media en una probabilidad determinada (95 % en la mayoría de los casos). Se ve afectado por la varianza y el número de datos disponibles.

Dada la dispersión natural de los datos biológicos y mas de este tipo de análisis que no presentan capacidad de control con un patrón, hemos preferido realizar una invalidación de medidas que se ha realizado mediante el test de la Q de Dixon, en el que tiene en cuenta la diferencia de los valores máximos y mínimos respecto a la media, inhabilitando aquellos que superen el valor preestablecido para este estimador.

PARTICIPANTES

El número de participantes ha sido de 8, de los cuales 5 eran Laboratorios de Sevilla, 1 de Huelva, 1 de Valencia y 1 de Vigo.

Los Laboratorios que no corresponden a la provincia de Sevilla reciben la muestra, vía mensajería urgente, el día siguiente a su toma, con lo que algunos aspectos pueden alterarse con el tiempo e incluso con los problemas de transporte (pérdidas, temperatura,...).

Con el fin de minimizar estos problemas, de los que tenemos constancia que han surgido en este ejercicio, proponemos para los siguientes que cada participante que no pueda recoger personalmente la muestra, envíe una nevera para que se le remita con la muestra y se eviten al menos los problemas de estabilidad y pérdida de esta.

De los ocho participantes, la experiencia en la aplicación de las técnicas descritas en el manual de GBS es bastante variable:

- El 50 % de los participantes trabajan usualmente con esta metodología
- El 12 % de los participantes tiene altos conocimientos en análisis biológicos de fangos activos, pero no específicos de esta metodología
- El 38 % de los participantes se ha iniciado recientemente en esta metodología y no tiene prácticamente ningún conocimiento previo en análisis biológicos de fangos activos.

RESULTADOS

FECHA: 25/02/03

MUESTREO								
PARTICIPANTE	1	2	3	4	5	6	7	8
MACROSCOPIA	30	12	16,5	18	7,5	12	21	16,5
MICROSCOPIA	47	41	47	57	17	57	44	43
INDICE DE FIL	-	-	-	-	-	-	-	0,215
CATEGORIA DE FIL	3-4	3-4	4	3	4	-	4	3
FIL DOMINANTE	NOCARDIA	NOCARDIA	1863/BACILLUS		NOCARD- HALISCO	-	411	NOCARDIA
FIL SECUNDARIO	1863	1863	NOCARDIA	HALISCO-1863	THIOT II- 0914- 1851	-		1863
EFFECTO FLOCULO	DISGREGACION FLOCULAR. CLARIFICADO TURBIO	DISGREGACION FLOCULAR. TURBIDEZ EN EL CLARIFICADO	TURBIDEZ Y DISGREGACION	DISGREGACION		-	COMPACTACION DEL FLOCULO	HINCHAZON.LIGERA PRESENCIA DE FLOTANTES EN V-30
OTROS FIL	021N- HALISCO- SPAEROTILUS- 1701	SPHAEROTILUS N- 1702- BEGIATOA- HALISCO.	SPHAEROTILUS- 1701	NOSTOCOIDA- SPHAEROTILUS- NOCARDIA	SPHAEROTILUS- NOSTOCOIDA I Y II- THIOTRIX I- 1863	-		021N- HALISCO- BEGIATOA- NOSTOCOIDA L. I- SPHAEROTILUS N.
CORTES DIAGONAL	-	-	-	-	-	-	-	-
m/ml FILAMENTOS	-	-	-	544,52	-	129,9		-
DENSIDAD (org/l)	9,34,E+06	13,18,E+06	13,66,E+06	15,98,E+06	29,89,E+06	9,50,E+06		9,90,E+06
INDICE DE SHANON	1,86	2,055	1,823		-	1,7		2,012
INDICE DE MADONI	9	6	7	9	2	8		10
CLASE MADONI	1	2	2	1	4	1		1
NUM DE ESPECIES	10	8	8	9	12	8	>6	12
GRUP DOMINANTE	B. REPTANTES	B. REPTANTE	B. REPTANTE	B. REPTANTE		B. REPTANTE		B. REPTANTE
OBSERVACIONES	BUENA SEDIMENTACION. FANGO BIEN COLONIZADO. BUEN RENDIMIENTO DE DEPURACION	SEDIMENTABILIDAD ADECUADA. CLARIFICADO ALGO TURBIO Y ABUNDANTES FLOCULOS EN SUSPENSION.	CARACTERISTICAS ESTRUCTURALES DE FLOCULO ADECUADO. TURBIDEZ DEL CLARIFICADO ASOCIADO A 1863. NOCARDIA ASOCIADA AL INTERIOR FLOCULAR AYUDANDO A SU ESTRUCTURA.	ORGANISMOS ASOCIADOS A BAJAS CARGAS MASICAS Y DEFICIENCIAS DE O.D.. ENTURBIAMIENTO DEL CLARIFICADO DEBIDO A 1863. EDAD DE FANGO LIGERAMENTE ALTA.	PRESENCIA DE BACTERIAS HELICOIDALES Y ZOOGLEA-	MICROBIOTA CARACTERISTICA DE BUEN RENDIMIENTO DE DEPURACION Y CARGAS MASICAS BAJAS. MUESTRA RECIBIDA EN MALAS CONDICIONES. RESULTADOS POCO FIABLES.	EN LA V-30 QUEDAN FLOCULOS EN LA SUPERFICIE	

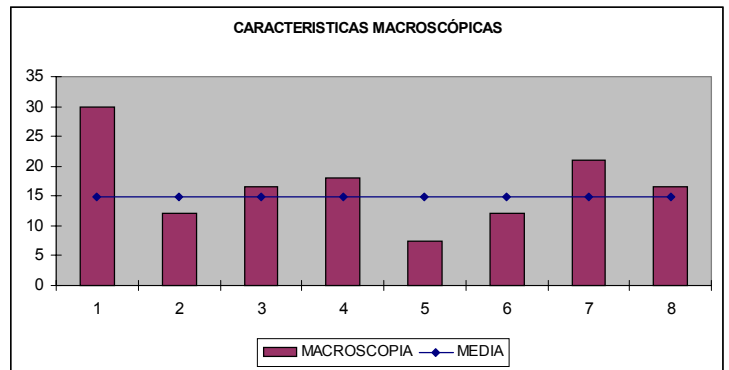
ANÁLISIS DE DATOS

En este apartado se realizara un análisis estadístico de los valores obtenidos en cada uno de los apartados en los que está dividido el análisis de fangos activos:

CARACTERIZACIÓN MACROSCÓPICA Y MICROCÓPICA DEL FANGO ACTIVO

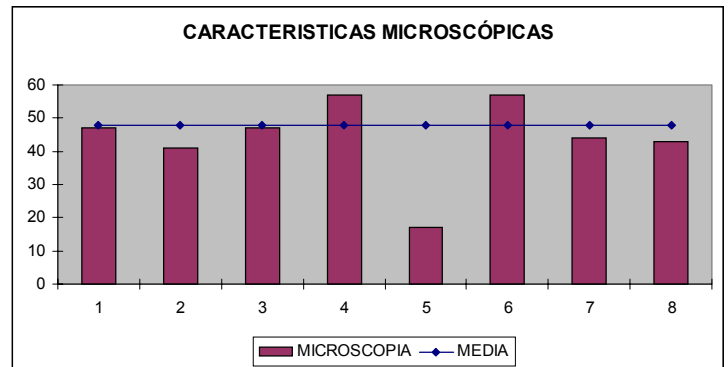
- MACROSCOPIA

MACROSCOPIA	
1	30
2	12
3	16,5
4	18
5	7,5
6	12
7	21
8	16,5
MEDIA	16,7
VARIANZA	6,38
PARTICIP DESCARTADO	1
MEDIA CORREG	14,8
VAR CORREG	4,19



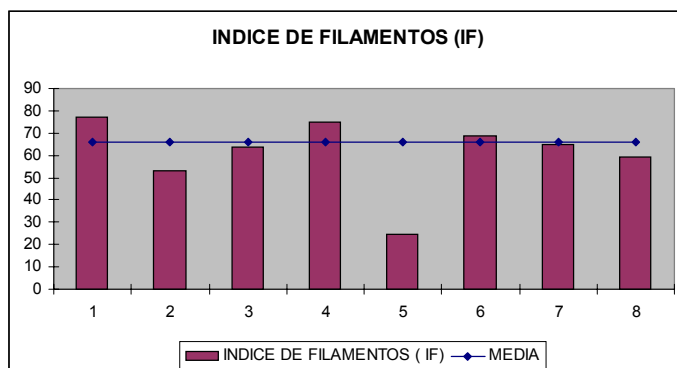
- MICROSCOPIA

MICROSCOPIA	
1	47
2	41
3	47
4	57
5	17
6	57
7	44
8	43
MEDIA	44,13
VARIANZA	11,7
PARTICIP DESCARTADO	5
MEDIA CORREG	48
VAR CORREG	6,02



- ÍNDICE DE FANGO

INDICE DE FILAMENTOS (IF)	
1	77
2	53
3	63,5
4	75
5	24,5
6	69
7	65
8	59,5
MEDIA	61
VARIANZA	15,56
PARTICIP DESCARTADO	5
MEDIA CORREG	66
VAR CORREG	7,83

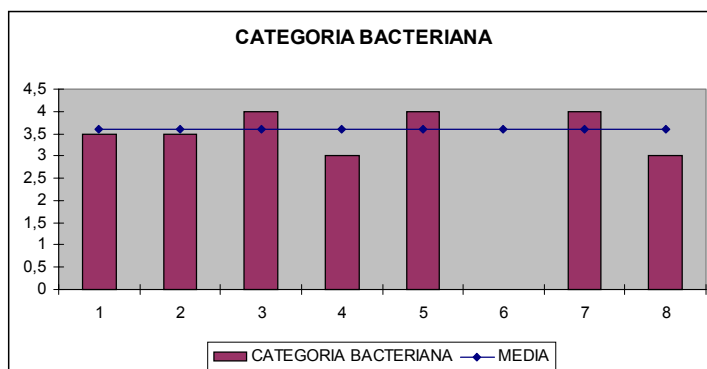


CATEGORIA
BUENO
REGULAR
BUENO
BUENO
MALO
BUENO
BUENO
REGULAR



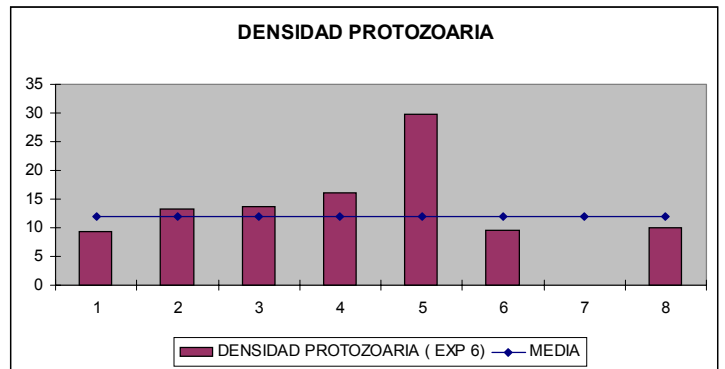
- CATEGORIA BACTERIANA

CATEGORIA BACTERIANA	
1	3,5
2	3,5
3	4
4	3
5	4
6	
7	4
8	3
MEDIA	3,6
VARIANZA	0,42



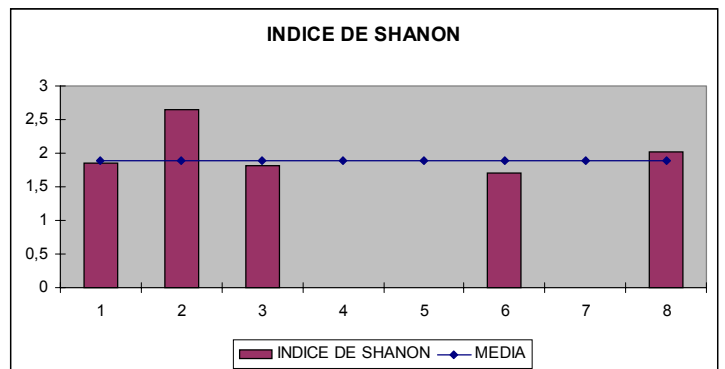
- DENSIDAD PROTOZOARIA

DENSIDAD PROTOZOARIA (EXP 6)	
1	9,34
2	13,18
3	13,66
4	15,98
5	29,89
6	9,5
7	
8	9,9
MEDIA	14,49
VARIANZA	6,7
PARTICIP DESCARTADO	5
MEDIA CORREG	11,93
VAR CORREG	2,51



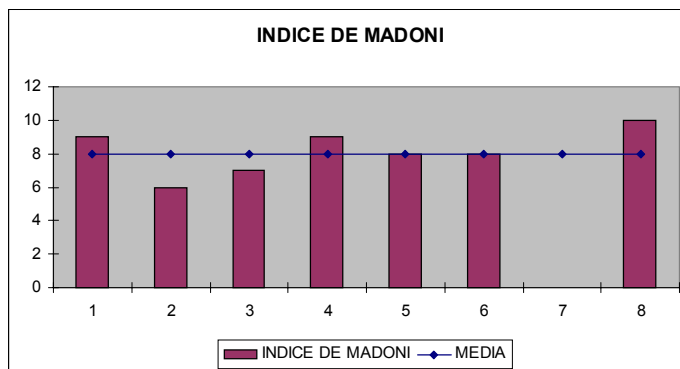
- ÍNDICE DE SHANON

ÍNDICE DE SHANON	
1	1,86
2	2,655
3	1,823
4	
5	
6	1,7
7	
8	2,02
MEDIA	1,89
VARIANZA	0,13

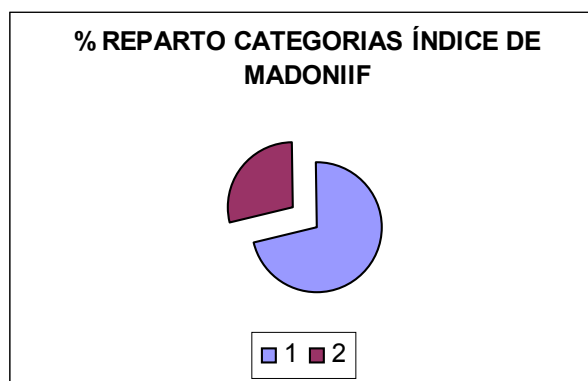


- ÍNDICE DE MADONI¹

ÍNDICE DE MADONI	
1	9
2	6
3	7
4	9
5	8
6	8
7	
8	10
MEDIA	8
VARIANZA	1,24



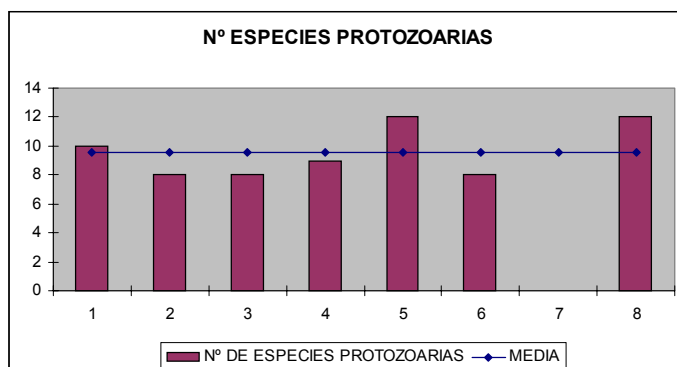
CLASE
1
2
2
1
1
1
1



¹ El valor correcto para el Índice de Madoni en el participante 5 en función de los conteos realizados es 8, ya que se encuentra en una F de 28/30 pequeños flagelados

- Nº ESPECIES PROTOZOARIAS

Nº DE ESPECIES PROTOZOARIAS	
1	10
2	8
3	8
4	9
5	12
6	8
7	
8	12
MEDIA	10
VARIANZA	1,68
INTERV CONF	



- GRUPO DOMINANTE

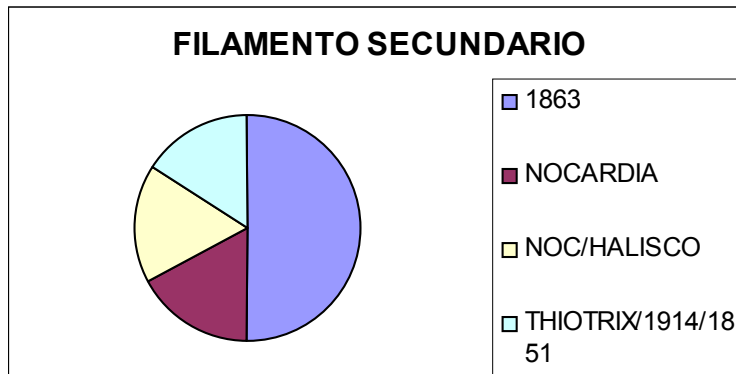
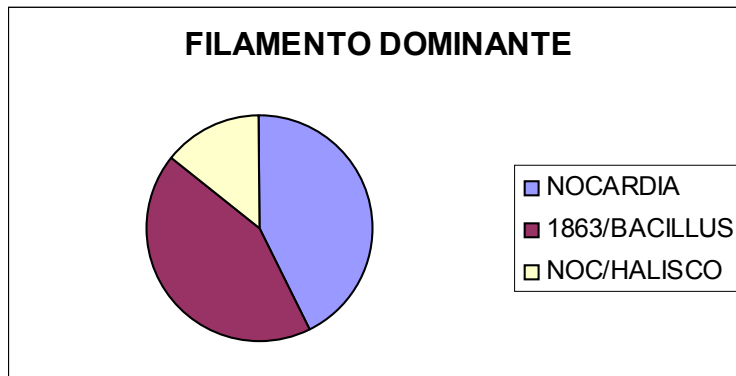
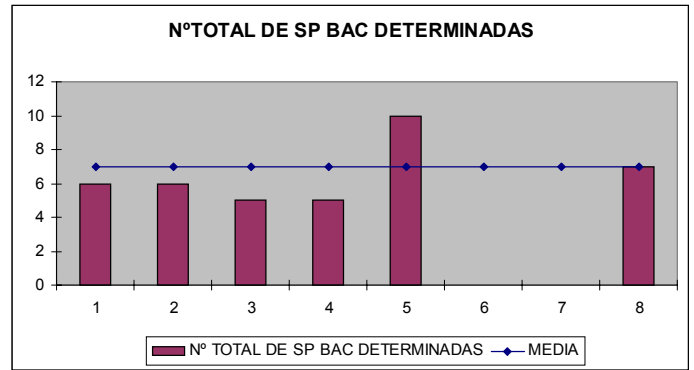
GRUPO DOMINANTE	
1	REPTANTE
2	REPTANTE
3	REPTANTE
4	REPTANTE
5	
6	REPTANTE
7	
8	REPTANTE



- IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS FILAMENTOSAS

FILAMENTOS	DOMINANTE	SECUNDARIO	OTROS
1	NOCARDIA	1863	SPHAEROTILUS, HALISCO, 021N, 1701
2	NOCARDIA	1863	SPHAEROTILUS, 1702, BEGGIATOA, HALISCO
3	1863/BACILLUS	NOCARDIA	SPHAEROTILUS, 1701
4		HALSICO-1863	NOSTOCOIDA, SPHAEROTILUS, NOCARDIA
5	NOC/HALISCO	THIOT II/0914/1851	SPHAEROTILUS, NOSTOCOIDA I Y II, THIOTRIX I, 1863
6			
7	DESCARTADO		
8	NOCARDIA	1863	021N, HALISCO, BEGGIATOA, NOSTOCOIDA I, SPHAEROTILUS

Nº TOTAL DE SP BAC DETERMINADAS	
1	6
2	6
3	5
4	5
5	10
6	
7	
8	7
MEDIA	7
VARIANZA	1,71



CONCLUSIONES

* VALOR ESTIMADO DE LA MUESTRA ANALIZADA

RESULTADOS MEDIOS ESTIMADOS DE LA MUESTRA	
INDICE DE FANGO	BUENO/REGULAR
CATEGORIA BACTERIANA	3/4
IDENTIF DE FILAMENTOS	NOCARDIA/1863
EFEECTO DEL FILAMENTO	DISGREGACIÓN Y TURBIDEZ
DENSIDAD PROTOZOARIA APROXIMADA	12 EXP 6
ÍNDICE DE MADONI	8
CLASE DE MADONI	1: FANGO BIEN COLONIZADO
Nº DE ESPECIES ENCONTRADAS	9-10
GRUPO DOMINANTE	BACTERIOFAGO REPTANTE
RENDIMIENTO SEGÚN MADONI	BUEN RENDIMIENTO DEPURADOR

* CONCLUSIONES GENERALES

En este apartado hemos de tener en cuenta la distinta formación de los participantes en este ámbito.

El esfuerzo realizado por todos ha sido considerable y muy fructífero.

El interés y el tiempo dedicado ha merecido la pena, tanto a nivel personal en los que seguramente todos nos habremos enriquecido y a nivel de resultados, ya que la homogeneidad de estos es más que aceptable.

Dentro de las conclusiones generales se van a registrar algunas situaciones que merecen atención:

- La repetitividad del Índice de fango muy buena. Si bien existe variabilidad entre las valoraciones realizada a los parámetros macroscópicos y microscópicos, el resultado final es un valor de IF repetitivo, que nos permite tener un criterio de clasificación del fango activo desde pésimo a óptimo. Es de reseñar el participante uno para la macro y el cinco para la micro, donde la caracterización está muy desviada frente a la media y que puede deberse a no tener otras muestras de referencia, salvo la que se analiza cotidianamente.

- Valoración de las características problemáticas:

De las características macroscópicas, parece ser la turbidez el parámetro más problemático, o al menos en el que la valoración ha sido más dispar. Aunque el 50 % de los participantes se decantan por un valor *medio*, existe otro 25 % que opina que el clarificado presenta un grado *alto* de turbidez y otro 25 que presenta *baja* turbidez. Los valores extremos, sobre todo el desfavorable, *alta turbidez*, podría achacarse a posibles alteraciones de la muestra debido a su transporte y al tiempo transcurrido desde su toma a su observación.

El resto de las características valoradas en el estudio, flóculos en suspensión y sedimentación, están muy repartidas entre los valores *medio* y *alto*, lo cual es un resultado aceptable dado el carácter subjetivo que pueden llegar a tener estos parámetros y la influencia que puede tener su valoración el hecho de habituarse demasiado a un solo tipo de muestra.

En cuanto a las características microscópicas, excepto en la valoración de los flóculos en suspensión y diversidad de protozoos, en el resto de los parámetros como mínimo el 75% de los participantes coinciden en la valoración, siendo del 100% en parámetros como forma flocular, textura y cobertura, que parecen ser las características menos problemáticas de valorar, ya que, en cierto modo, son cuantificables y no dependen demasiado de la experiencia del observador.

Respecto a la valoración de la diversidad de protozoos, aclararíamos dos puntos. En primer lugar, en este parámetro no tenemos en cuenta ni los pequeños flagelados ni los metazoos. Por otro lado, siempre que después de valorar el Índice de Fango realicemos un recuento de microorganismos, debemos rectificar la valoración de la diversidad de protozoos, ya que, al ser el recuento un estudio más minucioso de la microfauna, podemos encontrar especies que no observamos en la valoración general del fango. Teniendo en cuenta esto, la valoración de este parámetro sería mayoritariamente *alta*, frente a *media* que considera el resto de los participantes.

A la hora de contar microorganismos es importante determinar el número de especies encontradas aunque su identificación no sea posible, siempre y cuando no estemos ante una especie mayoritaria con un claro valor bioindicador, en cuyo caso sí sería muy útil.

Por último, en cuanto a los filamentos en solución es necesario indicar que se considera *alto* su valor cuando observemos filamento en el espacio interflocular con una categoría numérica de 2=*algunos*. Con esta aclaración es posible que las variaciones encontradas disminuyeran.

- Se ha constatado la problemática al definir el filamento dominante y secundario. Esta situación puede ocurrir debido a que encontramos *Nocardia* en el interior flocular y *1863* en el exterior; Por ejemplo el participante número tres indica *1863* como dominante. Esta localización interior puede confundir respecto a la dominancia, habiendo quedado enmascarada para algunos participantes.
- El efecto posible de *Nocardia* en este caso, parece ser el aumentar la estructura del flóculo, ya que se encuentra circunscrita prácticamente a él.
- Identificación correcta de filamentos en seis de los ocho participantes
- Valoración muy similar del número de especies identificadas de ciliados
- El conteo de los pequeños flagelados para la cámara de F-R se encuentra en el margen de 10-100, indicando la segunda columna de la tabla de Madoni. No son grupo dominante al ser la $F < 100$ unidades.
- El efecto del análisis del fango activo en aquellos participantes en los que se ha debido realizar un traslado de la muestra de más duración, pudiendo llegar a dos días se ha notado. Si bien la identificación bacteriana es similar, se ha detectado un aumento en el metabolismo del azufre (vease *0914*) debido al proceso de anoxia, se ha detectado también un

aumento en el crecimiento epifítico de 1701 y la rotura y deterioro de los filamentos y protozoos, que han complicado su identificación.

- Aclaración sobre el cálculo de densidad y grupo dominante en el Índice de Madoni:

- Los pequeños flagelados son dominantes en el caso que la diagonal de F-R determine mas de 100 organismos. Y la densidad es mayor de $5 \cdot 10^8$ Ind/mL

- En el resto de los casos no se incluyen en la densidad general, ya que F-R da margenes y no valores reales. Para

F-R menor de 10 la densidad aproximada de pequeños flagelados es menor de 50000 ind/mL. Si esta ente 10-100 manejamos densidades entre 50000 y $5 \cdot 10^8$ Ind/mL .