EJERCICIOS INTERLABORATORIOS DE ESTANDARIZACIÓN DE ANÁLISIS MICROBIOLÓGICOS APLICADOS AL CONTROL DE LOS FANGOS ACTIVOS.

E. Rodríguez 1/2 y N. Fernández 1/3
1 Grupo Bioindicación Sevilla (GBS. gbs@asociaciongbs.com; 2 UTE EDAR TABLADA, 2 EDAR COPERO

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).

ÍNDICE DEL INFORME INTERLABORATORIO:

1. Introducción
2. Participantes
3. Resultados
4. Análisis de datos
- **Caracterización macroscópica y microscópica del fango activado (IF)**
- **Identificación y cuantificación de bacterias filamentosas**
- **Caracterización de la microfauna**
- **Otros parámetros de interés**

5. Conclusiones
- **Generales**
- **Valoración de la muestra**

6. Consideraciones para los próximos ejercicios interlaboratorios
7. Agradecimientos
8. Bibliografía

Anexo I: Reportaje fotográfico: Macroscopía y Microscopía - Bacterias filamentosas - Protistas y Metazoos.

Anexo II: Estudio respirométrico de la muestra. Surcis, S.L.,

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

Anexo IV: Microscopía electrónica

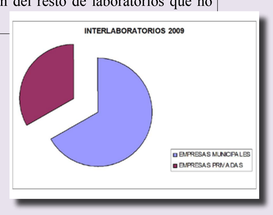
Anexo V: Estudio biológico. Realizado por Dª Lucía Arregui, Dª Raquel Liébana, Dª Blanca Pérez-Uz y Dª Susana Serrano, Universidad Complutense de Madrid.

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

ESQUEMA DE ORGANIZACIÓN DE UN EJERCICIO INTERLABORATORIO (G-ENAC-14, 2008)

1.- Divulgación del ejercicio de intercomparación (analítica y calendario)

Descripción de la planificación del trabajo	Convocatoria anual
Nº de rondas	Dos, generalmente Febrero y Mayo Envío calendario con antelación al ejercicio. Notificación mediante circular informativa en la que se incluye: dirección de recogida de la muestra, material solicitado, persona de contacto y fechas importantes (fecha recomendada de envío de los materiales solicitados con modalidad retorno/Fecha de envío de la muestra/Fecha de recepción de la muestra por el participante/Fecha de análisis/Protocolo de conservación de muestras si se recibe con anterioridad a la fecha especificada para realizar el análisis (Rodríguez *et al.* 2004 y 2005)/ Fecha de envío de resultados).
Rango de trabajo	Valoración del IF (Jiménez et al. (2001), Rodríguez *et al.* 2004)/ Valoración de las bacterias filamentosas (Jenkins *et al.* (1996, 2004) y Eikelboom (1983, 2006).)./ Valoración de la comunidad protozoaria (Madoni, 1994 y Margalef, 1981)/ Valoración general de la calidad del fango.Los parámetros contrastados en cada ejercicio recogen la mayoría de los matices necesarios en la caracterización del fango.
Nº de participantes previstos	Máximo de participantes admitidos por convocatoria: 30 Confidencialidad: Asignación de código numérico para identificar cada participante No se incluyen los resultados que no posean dicho código. No se facilitará información del resto de laboratorios que no sean el propio.

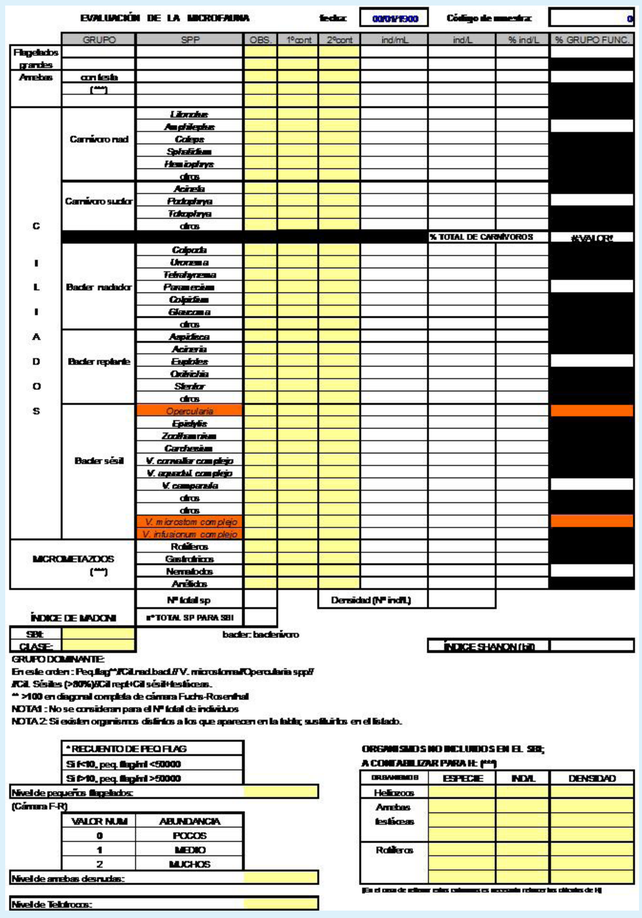


Reparto porcentual entre los participantes del ejercicio interlaboratorio 2009, para empresas municipales y privadas de aguas.

2.- Recepción de solicitudes de participantes

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

Tipo de muestra	**Muestras por cada ronda**: EDAR urbana (Análisis completo) y una EDAR industrial (Flóculo y bacterias filamentosas). **Selección muestras (Urbana e Industrial):** 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. **Toma de Muestra:** licor mezcla justo a la salida del reactor biológico, previo a la decantación secundaria depuradora, en el momento de mayor homogenización, con un volumen en torno a 30 litros. **Traslado y tratamiento preliminar:** Directamente a las instalaciones de GBS, homogenización, división en tantas alícuotas de 1,5 L en frasco de plástico de 2 L de cierre hermético, como participantes haya. **Alícuotas:** rellenadas hasta aproximadamente un tercio de la capacidad del frasco cámara de aire para evitar la anoxia durante el transporte. Muestra urbana Muestra Industrial
Transporte y estabilidad de la muestra.	**Participantes:** Deben enviar a la dirección de recogida, un mensajero con una nevera, con: Frasco de plástico de 2 L de cierre hermético vacío, placas refrigerantes y material de relleno de la muestra para evitar movimientos bruscos. **Atención al mensajero**: recepción, inclusión en la nevera de la muestra urbana e industrial, hojas de trabajo a rellenar y en el caso de la primera entrega, código de participante. **Tipo servicio mensajería**: garantizar la entrega en destino, como muy tarde, al siguiente día de la toma de muestra, para evitar alteraciones en la misma. Modalidad de envío: "*Con retorno*" **Identificación muestra**: El bote irá etiquetado con el código de participante, el número del ejercicio y la fecha de envasado. **Análisis previo**: Estudio de comprobación de la estabilidad de la muestra y posibles efectos sobre resultados finales. Comparativa de resultados día envío/ día análisis.
Instrucciones de trabajo	**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



Hoja de Excell que realiza los cálculos de densidades yu porcentajes de protistas de forma automática

4.- Recepción de boletines de datos. análisis de resultados

Entrega recopilación inicial datos de los participantes: 15 días hábiles a partir de la fecha límite de entrega de resultados.

PARTICIPANTE	1	2	3	4	...	21	22
MACROSCOPIA	30	21	30	25,5		21	30
MICROSCOPIA	43	36	40	34		47	31
INDICE DE FANGOS	73	57	70	59,5		68	61
CATEGORIA DE FILAMENTOS	5	5	5	5		5	4
FILAMENTO DOMINANTE	M. PARVICELLA	M. PARVICELLA	N. LIMICOLA	THIOTHRIX SP		M. parvicella	M. PARVICELLA
FILAMENTO SECUNDARIO	T1701	T1701 Y HYDROSSIS	M. PARVICELLA				H.HYDROSSIS
EFECTO FLOCULO	DISGREGACIÓN FLOCULAR	DISGREGACIÓN FLOCULAR	ESPONJAMIENTO MODERADO	DISGREGACIÓN FLOCULAR			
OTROS FILAMENTOS	H. HYDROSSIS, N. LIMICOLA, T1702 Y T0092	N.LIMICOLA, Y T1851	T0211	T0914			GALO, T701, T0731N, T0041, N. LIMICOLA
NUMERO DE INTERCECCIONES	7,63	7,03		19,47			5,75
m/ml FILAMENTOS	191,67	176,72		489,16			144,47
DENSIDAD (org/l)	4×10^6	$4,22 \times 10^6$	10×10^7	$4,34 \times 10^6$		$3,94 \times 10^6$	$3,04 \times 10^6$
INDICE DE SHANON	2,71	2,48	2,03	2,53			3,22
INDICE DE MADONI	8	8	8	6		9	9
CLASE MADONI	I	I	I	II		I	I
NUMERO DE ESPECIES	10	9	10	10		11	13
GRUPO DOMINANTE	Bact. Sésiles	Bact. Sésiles	Bact. Sésiles	Bact. Sésiles		Bact. Sésiles	Bact. Sésiles

Tabla recopilatoria general de los datos aportados por los 22 participantes de la primera convocatoria de 2009 (Se han eliminado los registros desde el participante 5 al 20)

Tratamiento técnico y estadísticos de los datos:

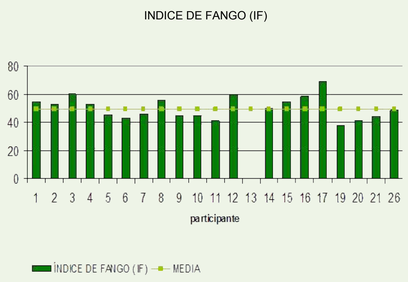
Valor medio

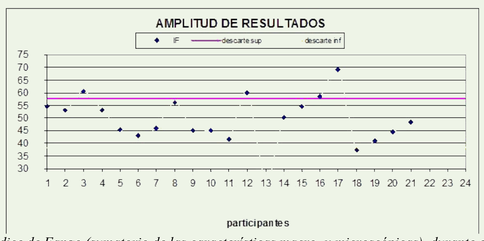
Incertidumbre

Invalidación de medidas:

- test de la Q de Dixon
- Intervalos de confianza, representados por desviaciones de la media del 20%.

ÍNDICE DE FANGO (IF)		CATEGORÍA
1	54,5	Regular
2	53	Regular
3	60,5	Bueno
4	53	Regular
5	45,5	Regular
6	43	Regular
7	46	Regular
8	56	Regular
9	45	Regular
10	45	Regular
11	41,5	Regular
12	60	Bueno
13	26	Malo
14	50	Regular
15	54,5	Regular
16	58,5	Regular
17	69	Bueno
19	37,5	Malo
20	41	Regular
21	44,5	Regular
26	48,5	Regular
MEDIA	49,2	
VARIANZA	9,43	
PARTICIP DESCARTADO	13	
MEDIA CORREG	47,9	
VAR CORREG	7,99	



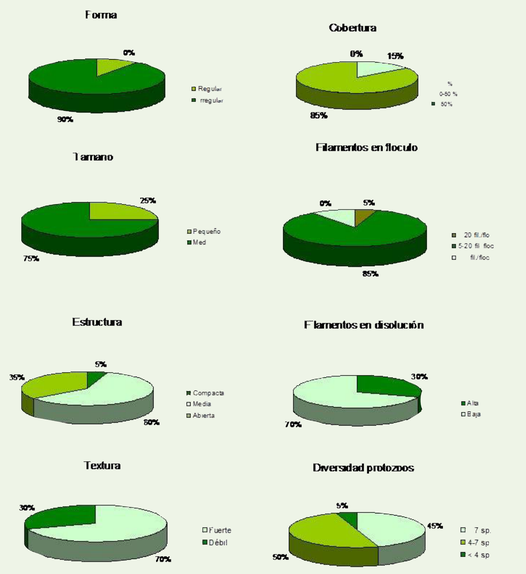


Valoración por parte de los participantes del Índice de Fango (sumatorio de las características macro- y microscópicas), durante el ejercicio de intercomparación de Mayo de 2006, así como la media y varianza calculadas. La aplicación del test estadístico ha descartado el participante 13. Tras aplicar las desviaciones del 20 % de la media, deben revisar su metodología los participantes que quedan fuera de este rango.

Resultados medios de referencia de la muestra analizada: permite a cada participante evaluar su capacitación.

RESULTADOS MEDIOS ESTIMADOS DE LA MUESTRA	
ÍNDICE DE FANGO	67 (BUENO)
CATEGORÍA BACTERIANA	4 (127 m/mL)
IDENTIFICACIÓN DE FILAMENTOS	Galo
DENSIDAD DE PROTISTAS APROXIMADA	7, 2 (EXP 6)
ÍNDICE DE SHANNON	2,3 bits
ÍNIDICE DE MADONI	9
CLASE MADONI	I: Fango estable y bien colonizado
Nº DE ESPECIES ENCONTRADAS	12
GRUPO DOMINANTE	TESTACEAS/ REPTANTES
RENDIMIENTO SEGÚN MADONI	Muy buen funcionamiento
V30 ESTIMADA	145 m/mL
SSLM	1245 mg/L
IVF	120

Resultados medios estimados para la muestra analizada durante el ejercicio intercomparación de Mayo de 2009.



Reparto porcentual de la asignación de características microscópicas de la muestra (forma, tamaño, estructura, textura y corbertura flocular, filamentos en flóculos y en disolución, diversidad de especies) durante el ejercicio intercomparativo de Mayo de 2007.

5.- Envío de informe de resultados a los participantes y reunión final.

Fecha: Final Octubre:

- Foro de encuentro de profesionales del sector.
- Debate sobre las particularidades de las muestras
- Incidencias del análisis
- Modificaciones para el próximo ejercicio
- Unificación de criterios de los profesionales del análisis aplicado en este tipo de muestras.
- Entrega certificado de participación que acredite su participación en el circuito.

REQUISITOS

Convenios GBS-empresas

Experiencia previa: No necesaria

Materiales necesarios: microscopio con objetivos de 10X, 40X y 100X así como del material para su uso (portaobjetos, cubreobjetos), probeta de 100/1000 mL, cámara de Fuchs-Rosenthal, reactivos y material necesario para las tinciones Neisser, Gram, test de azufre y PHB.

CONCLUSIONES

Los ejercicios de intercomparación entre laboratorios son:

- Herramienta básica, sobre todo en análisis de tipo microbiológico, para unificar criterios
- Ajuste de la metodología aplicada.
- Oportunidad de comparar técnica y resultados con otros participantes
- Posibilidad de afrontar un "problema real" (muestra) con un protocolo validado y comparar los resultados obtenidos con la valoración efectuada, sobre esa misma muestra, por otros profesionales.
- Es posible obtener datos biológicos repetitivos para la misma muestra, con distintos operadores.
- Formación de los participantes con ojo crítico y evaluador
- Optimización de los procesos depuradores en las EDAR
- Herramienta de trabajo que permite obtener información adicional del sistema depurador
- Adquisición de experiencia contrastable en estos análisis.
- Herramienta clave de competencia frente a clientes externos.

BIBLIOGRAFÍA

Eikelboom, D. (2006). Identification and Control of Filamentous Micro-organisms in Industrial Wastewater Treatment Plants. *Multi-Media Training CD*. IWA Publisingh. ISBN: 1843390965.

Eikelboom, D. H. y Van Buijsen, H. J. J. (1983). Microscopic sludge investigation manual, 2nd Edn. TNO Research Institute of Environnmental Hygiene, Delft.

ENAC. Expresión de la incertidumbre de medida en las calibraciones. Rev. 1. 1998

ENAC. Guia sobre la participación en programa de intercomparaciones. G-ENAC-14. Rev. 1. Septiembre 2008

Isac, L. (2004). "Resultados y conlusiones obtenidas de los interlaboratorios realizados en el circuito 2003-2004". Comunicación oral en la **Jornada de Transferencia de Tecnología** sobre "Ejercicios interlaboratorios en fangos activos como sistema de control de calidad en la EDAR" (Sevilla, Octubre de 2004).

Isac, L., Rodríguez, E., Fernández, N. y Salas, M.D (2005). "Informe del circuito interlaboratorio 2005 en fangos activo **609-7282-8**.

Isac, L., Rodríguez, E., Fernández, N. y Salas, M.D. (2006). "Circuito interlaboratorio 2006 en fangos activados. Aplicación práctica del estudio microbiológico y respirométrico en la EDAR".GBS. **ISBN 978- 84-611-2747-1**

Isac, L., Rodríguez, E., Fernández, N. y Salas, M.D. (2007). "Circuito interlaboratorio 2007 en fangos activados. Aplicación práctica del estudio microbiológico y respirométrico en la EDAR".GBS. **ISBN 978-84-612-1345-0**

Jenkins, D., Richard, m. G. y Daigger, G. T. (2004). *Manual on the Causes and Control of Activated Sludge Bulking and Foaming*. Lewis Publishers (Michigan).

Jenkins, D., Richard, M. G. y Daigger, G.T. (1996). Manual on the causes and control of activated sludge *Bulking* and foaming. 2nd Edition. Lewis publishers (Michigan).

Jiménez, C., Fernández, N., de la Horra, J.M., Rodríguez, E., Isac, L., Salas, M.D. y Gómez, E. (2001). "Sistema rápido de estimación de los rendimientos en depuración de una EDAR 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.

Margalef, R. (1981). *Ecología*. Ed. Omega, Barcelona.

Pulles, M. R., Mayari, R. y Martínez, M. (2006). "Criterios para la acreditación de laboratorios que realizan ensayos microbiológicos según NC-ISO/IEC 17025:00". ***CENIC Ciencias Biológicas*, 265, nº 1. 32-36.**

Rodríguez, E., Fernández, N. y Reina, E. (2008). "Circuito interlaboratorio 2008 en fangos activados. Aplicación práctica del estudio microbiológico y respirométrico en la EDAR".GBS. **ISBN 978-84-613-0712-8**

Rodríguez, E., Isac, L., E. Álvarez, M., Zornoza, A., y Fernández, N. (2005). "Tratamiento y conservación de muestras para análisis microbiológicos de fangos activos". ***Tecnología del Agua*, 265, 60-70.**

Rodríguez, E., Isac, L., Fernández, N. y Salas, M.D. (2004). "Manual de Trabajo para Análisis Biológicos en Fangos Activados". Jornada de Transferencia de Tecnología sobre "Ejercicios interlaboratorios en fangos activos como sistema de control de calidad en la EDAR" (Sevilla, Octubre de 2004) **I.S.B.N. 978-608-0189-6.**

Sagrado, S., Bonet, E., Medina, M. J. Martín, Y. (2005). "Manual práctico de calidad en los laboratorios. Enfoque Iso 17025". ***AENOR. ISBN: 84-8143-4403*.**

AGRADECIMIENTOS

Queremos dejar constancia de nuestro agradecimiento a cada una de las empresas y centros a los que pertenecemos, especialmente a EMASESA, por su apoyo y respaldo a nuestro trabajo, así como a los nuevos colaboradores y a todos los participantes por el trabajo desarrollado.