SONDERAPPLIKATION 12.24 de

REF 970001 / 970002

Screeningtest BioFix® *A/N-Tox*

Methode:
Amperometrisches Verfahren zur Bestimmung der generellen Hemmwirkung von Probeninhaltsstoffen auf die mikrobielle Nitrifikation durch gleichzeitigen Einsatz ammoniak- und nitritoxidierender Bakterienstämme. Der Test erlaubt keine differenzierte Aussage, ob speziell die Ammoniak- oder die Nitritoxidationsstufe gehemmt wird. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als % Hemmung des Sauerstoffverbrauches in der Probelösung im Vergleich zu einer ungehemmten Kontrolle. Zur Testdurchführung werden die Reagenziensätze „BioFix® Nitrifikationshemmtest *A-Tox*“ (REF 970001) und „BioFix® Nitrifikationshemmtest *N-Tox*“ (REF 970002) benötigt.

Messbereich:	**0 – 100 % Hemmung**
Reaktionszeit:	**10 min**
Reaktionstemperatur:	**Raumtemperatur**

Ausführung:
Benötigtes Zubehör: BioFix® Nitrifikationshemmtest *A-Tox* (REF 970001), BioFix® Nitrifikationshemmtest *N-Tox* (REF 970002), Starter-Set für BioFix® Nitrifikationshemmteste (REF 970101), CHROMAFIL® Einmalfilter unsteril, Porengröße 0,45 µm (REF 91652), Sauerstoffmessgerät, Magnetrührer, Stativ mit Klemmen, Kolbenhubpipetten mit Spitzen

Vor einer Testdurchführung die in den Beipackzetteln der Testkits BioFix® Nitrifikationshemmtest A-Tox und N-Tox aufgeführten Hinweise aufmerksam lesen und unbedingt beachten!

Es wird empfohlen, innerhalb einer Messreihe nach spätestens jeder zweiten Probenmessung (Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe bzw. Bestimmung der Nitrifikationshemmung der Probe) wieder eine neue Kontrollmessung durchzuführen!

Aufgrund des diesem Schnelltest als Messgröße zugrundeliegenden Prinzips der Sauerstoffmessung können **Proben mit sauerstoffzehrenden Inhaltsstoffen** die Messergebnisse verfälschen und potentiell nitrifikationshemmende Wirkungen überdecken. Zur Kompensation solcher sauerstoffzehrenden Effekte muss neben einer Kontrollmessung (Arbeitsschritt 2) und der eigentlichen Messung der Nitrifikationshemmung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 5) zusätzlich eine Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 4) durchgeführt werden, die bei der Berechnung des Endergebnisses einbezogen wird.

Empfohlene Messreihenfolge **mit** Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe:
K → EZ-P → NH-P → K → EZ-P→ NH-P → K → EZ-P → NH-P → K → …

Empfohlene Messreihenfolge **ohne** Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe:
K → NH-P → NH-P → K → NH-P → NH-P → K → NH-P → NH-P → K → …

K = Kontrollmessung (Arbeitsschritt 2)
EZ-P = Eigenzehrung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 4)
NH-P = Nitrifikationshemmung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 5)

Arbeitsschritt 1: Vorbereitung der nitrifizierenden Bakterien (Reagenz *A-Tox* R2 und *N-Tox* R2)

Die Reagenzien *A-Tox* R2 und *N-Tox* R2 gemäß den Anleitungen in den Beipackzetteln der jeweiligen Reagenziensätze für den Testeinsatz vorbereiten. Die dortigen Hinweise beachten!

Arbeitsschritt 2: Kontrollansatz

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.* Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. **Reagenz *A-Tox* R1**** zur Sauerstoffanreicherung für **30 s kräftig schütteln** und anschließend das **Reaktionsgefäß** bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Reagenz *A-Tox* R1**** füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit aufgesteckter Elektroden-Adapter vorsichtig in das Reaktionsgefäß bis zum luftdichten und blasenfreien Abschluss eintauchen (überschüssiges Medium läuft über). Diesen Ansatz ca. **1 – 2 min** auf Magnetrührer **rühren**, bis ein konstanter Sauerstoffwert vom Messgerät angezeigt wird.
   Unbedingt auf Luftblasenfreiheit des gesamten Testansatzes achten!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.
5. Reaktiviertes Reagenz *A- und N-Tox* R2 dem Kühlfach bzw. Eisfach entnehmen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R2** und **100 µL Reagenz *N-Tox* R2** (Wichtig! Nach Zugabe von *A-Tox* R2 und vor Zugabe *N-Tox* R2 die Mikroliterspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!) durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Anschließend beide Reagenzien wieder kühl (*A-Tox* R2 > 6 °C) bzw. eiskalt (*N-Tox* R2) lagern.
6. **Nach 2 min** (und vor Zugabe von Reagenz *A- und N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K0} (O_2-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 0 min).
   Wichtig: Während der 2 min, bevor Reagenz A-Tox R3 pipettiert wird, die Mikroliterspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!
7. Anschließend **sofort Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R3** und **100 µL Reagenz *N-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
8. **Nach 10 min Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K10} (O_2-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 10 min).

Arbeitsschritt 3: Probenvorbereitung

1. Bei stark getrübten Proben zunächst eine Vorfiltration mit Hilfe handelsüblicher (Falten-)Filter, durch Zentrifugation oder vergleichbare Methoden durchführen.
2. Den pH-Wert der Probe mit Hilfe von 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl auf pH **7,8 ± 0,2** einstellen.
3. **20 mL Probe** mit Hilfe von CHROMAFIL® Einmalfiltern (REF 91652) **feinfiltrieren** (zur Entfernung des größten Teils der natürlicherseits bereits vorhandenen Mikroflora, die das Messergebnis verfälschen kann).
4. Man gibt in ein geeignetes Gefäß (z. B. Becherglas ausreichender Größe)
   16 mL feinfiltrierte Probelösung und **4 mL Reagenz *A-Tox* R4**.***
5. Diesen Ansatz gut mischen und zur Sauerstoffanreicherung für 30 s kräftig schütteln.
   Anschließend als **Probelösung** zur Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe (Arbeitsschritt 4) bzw. zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung (Arbeitsschritt 5) einsetzen.

Arbeitsschritt 4: Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe

Hinweis: *Bei **nicht**-sauerstoffzehrenden Proben kann auf Arbeitsschritt 4 verzichtet werden. Im Rahmen der Testauswertung und Berechnung der Nitrifikationshemmung wird in diesem Falle die Variable* $\Delta\ O_{EZ\text{-}P} = 0$ *gesetzt!*

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.*Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit aufgesteckter Elektroden-Adapter vorsichtig in das Reaktionsgefäß bis zum luftdichten und blasenfreien Abschluss eintauchen (überschüssiges Medium läuft über). Diesen Ansatz ca. **1 – 2 min** auf Magnetrührer **rühren**, bis ein konstanter Sauerstoffwert vom Messgerät angezeigt wird.
   Unbedingt auf Luftblasenfreiheit des gesamten Testansatzes achten!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.

Wichtig: Es werden keine Reagenzien *A-Tox* R2 und *N-Tox* R2 zugegeben!

5. **Nach 2 min** (und vor Zugabe von Reagenz *A-Tox* R3 und *N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz $O_{EZ\text{-}P0}$ (O_2-Konzentration des Eigenzehrungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 0 min).
6. Anschließend **sofort Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze, diese danach mehrmals mit destilliertem Wasser gut spülen und Zugabe von 100 µL *N-Tox* R3.
7. **Nach 10 min Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz $O_{EZ\text{-}P10}$ (O_2-Konzentration des Eigenzehrungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 10 min).

Arbeitsschritt 5: Nitrifikationshemmung der Probe

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.* Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit aufgesteckter Elektroden-Adapter vorsichtig in das Reaktionsgefäß bis zum luftdichten und blasenfreien Abschluss eintauchen (überschüssiges Medium läuft über). Diesen Ansatz ca. **1 – 2 min** auf Magnetrührer **rühren**, bis ein konstanter Sauerstoffwert vom Messgerät angezeigt wird.
   Unbedingt auf Luftblasenfreiheit des gesamten Testansatzes achten!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.
5. Reaktiviertes Reagenz *A-Tox* R2 und *N-Tox* R2 dem Kühlfach bzw. dem Eisfach entnehmen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R2**** **und** **100 µL *N-Tox* R2** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Anschließend beide Reagenzien wieder kühl (*A-Tox* R2 > 6 °C) bzw. eiskalt (*N-Tox* R2) lagern.
6. **Nach 2 min** (und vor Zugabe von Reagenz *A-Tox* R3 und *N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz $O_{NH\text{-}P0}$ (O_2-Konzentration des Nitrifikationshemmungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 0 min).
   Wichtig: Während der 2 min und bevor Reagenz A-Tox R3 und N-Tox R3 pipettiert wird, die Mikroliterspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!
7. Anschließend **sofort Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R3**** und **100 µL Reagenz *N-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
8. **Nach 10 min Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz $O_{NH\text{-}P10}$ (O_2-Konzentration des Nitrifikationshemmungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 10 min).

Arbeitsschritt 6: Auswertung

(1) Sauerstoffverbrauch im Kontrollansatz: $\Delta O_K = O_{K0} - O_{K10}$

(2) Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe: $\Delta O_{EZ\text{-}P}{}^{\#} = O_{EZ\text{-}P0} - O_{EZ\text{-}P10}$

(3) Sauerstoffverbrauch im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe: $\Delta O_{NH\text{-}P} = O_{NH\text{-}P0} - O_{NH\text{-}P10}$

$^{\#}$ $\Delta O_{EZ\text{-}P} = 0$, falls keine O_2-Eigenzehrung der Probe vorhanden

Korrigierter Sauerstoffverbrauch im Probenansatz unter Berücksichtigung der Sauerstoff-Eigenzehrung:
$\Delta O_P = \Delta O_{NH\text{-}P} - \Delta O_{EZ\text{-}P}$

Endergebnis: % Hemmung der Gesamtnitrifikation = $[(\Delta O_K - \Delta O_P) : \Delta O_K] \times 100$

Zur Auswertung empfehlen wir die Verwendung des beigefügten Auswertebogens auf der Rückseite dieser Gebrauchsanweisung. Dieser kann zur eigenen Nutzung gerne vervielfältigt werden.

* Exakte Hinweise zum Aufstecken des Elektroden-Adapters auf die Sauerstoffelektrode entnehmen Sie bitte dem Beipackzettel des „Starter-Set für BioFix® Nitrifikationshemmteste“ (REF 970101).
** Alternativ kann auch Reagenz *N-Tox* R1 eingesetzt werden.
*** Alternativ kann auch Reagenz *N-Tox* R4 eingesetzt werden.
**** Wichtig! Nach Zugabe von *A-Tox* R2 und vor Zugabe *N-Tox* R2 die Mikroliterspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!
***** Wichtig! Nach Zugabe von *A-Tox* R3 und vor Zugabe *N-Tox* R3 die Mikroliterspritze mehrmals mit destilliertem Wasser gut spülen!

Interpretation der Messergebnisse:
Die erhaltenen Hemmwerte können folgendermaßen interpretiert werden:

0 – 10 % Hemmung	Probe nicht nitrifikationshemmend
10 – 20 % Hemmung	Probe potentiell nitrifikationshemmend
20 – 80 % Hemmung	Probe nitrifikationshemmend
> 80 % Hemmung	Probe verdünnen und noch einmal testen

Als weitere, normunabhängige Möglichkeit zum Vergleich und zur Einschätzung von ermittelten Hemmdaten an unterschiedlichen Probenahmeterminen oder zwischen verschiedenen Standorten kann das Ergebnis, in Anlehnung an die Ergebnisangabe anderer Biotoxizitätsteste (z. B. Leuchtbakterientest nach DIN EN ISO 11348), auch als G_{NH}-**Wert** angegeben werden. Dieser ist definiert als Kehrwert der ersten Verdünnungsstufe der Probe, bei der die Hemmung der Nitrifikation erstmals kleiner als 20 % ist.
Beispiel: Wird bei einer 1 + 1-Verdünnung einer Probe eine 35 %ige Hemmung ermittelt und bei einer 1 + 3-Verdünnung eine 15 %ige Hemmung, dann wäre in diesem Falle der G_{NH}-Wert = 4.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valenciennner Str. 11 · 52355 Düren · Deutschland
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***
Schweiz: MACHEREY-NAGEL AG · Hirsackerstr. 7 · 4702 Oensingen · Schweiz
Tel.: 062 388 55 00 · sales-ch@mn-net.com

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Auswertebogen Sonderapplikation Screeningtest *A/N-Tox* de

Analysedatum: _____ **Name des Durchführenden:** _____

Kontrollmessung (Arbeitsschritt 2)			Probenmessung									Ergebnis
			Proben-bezeichnung	Eigenzehrung (Arbeitsschritt 4)			Nitrifikationshemmung (Arbeitsschritt 5)			Korrigierter O_2-Verbrauch		
O_{K0} [mg/L]	O_{K10} [mg/L]	ΔO_K [mg/L] = $O_{K0} - O_{K10}$		$O_{EZ\text{-}P0}$ [mg/L]	$O_{EZ\text{-}P10}$ [mg/L]	$\Delta O_{EZ\text{-}P}$ [mg/L] = $O_{EZ\text{-}P0} - O_{EZ\text{-}P10}$	$O_{NH\text{-}P0}$ [mg/L]	$O_{NH\text{-}P10}$ [mg/L]	$\Delta O_{NH\text{-}P}$ [mg/L] = $O_{NH\text{-}P0} - O_{NH\text{-}P10}$	ΔO_P [mg/L] = $\Delta O_{NH\text{-}P} - \Delta O_{EZ\text{-}P}$		Hemmung [%] = $[(\Delta O_K - \Delta O_P) : \Delta O_K] \times 100$

O_{K0}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Kontrollansatz zum Zeitpunkt t_0 zu Versuchsbeginn

O_{K10}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Kontrollansatz nach t = 10 min Inkubation

ΔO_K: Sauerstoffverbrauch [mg/L] im Kontrollansatz nach t = 10 min Inkubation

$O_{EZ\text{-}P0}$: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe zum Zeitpunkt t_0 zu Versuchsbeginn

$O_{EZ\text{-}P10}$: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation

$\Delta O_{EZ\text{-}P}$: Sauerstoffverbrauch [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation

$O_{NH\text{-}P0}$: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe zum Zeitpunkt t_0 zu Versuchsbeginn

$O_{NH\text{-}P10}$: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation

$\Delta O_{NH\text{-}P}$: Sauerstoffverbrauch [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation

SPECIAL APPLICATION 12.24 en

REF 970001 / 970002

Screening Test BioFix® *A/N-Tox*

Method:
Amperometric method of determining the general inhibition effect of the substances contained in a sample on microbial nitrification via the simultaneous use of ammonia- and nitrite-oxidizing bacterial strains. The test does not enable specific assessment of whether the ammonia or the nitrite oxidation stage is inhibited. The results are specified as % inhibition of oxygen consumption in the sample solution in comparison to a non-inhibited control solution. In order to carry out this test, the reagent sets "BioFix® Nitrification Inhibition Test *A-Tox*" (REF 970001) and "BioFix® Nitrification Inhibition Test *N-Tox*" (REF 970002) are required.

Range:	**0 – 100 % inhibition**
Reaction time:	**10 min**
Reaction temperature:	**room temperature**

Procedure:
Requisite accessories: BioFix® Nitrification Inhibition Test *A-Tox* (REF 970001), BioFix® Nitrification Inhibition Test *N-Tox* (REF 970002), Starter Set for BioFix® Nitrification Inhibition Tests (REF 970101), CHROMAFIL® membrane filter, single-use, unsterile, pore size 0.45 µm (REF 91652), oxygen measuring device, magnetic stirrer, stand with clamps, piston pipettes with tips

Before carrying out a test, please read the information contained on the leaflets enclosed with the BioFix® Nitrification Inhibition Test A-Tox and N-Tox test kits and be sure to observe the instructions!

It is recommended to carry out a new control measurement after at least every second sample measurement (determination of sample's oxygen self-consumption or determination of the sample's nitrification inhibition) during a measuring sequence!

Owing to the principle of oxygen measurement that this quick test is based on as the measurement size, ***samples with oxygen consuming contents*** *can falsify the measurement results and conceal potential nitrification inhibition effects. To compensate for such effects, an additional calculation of the oxygen self-consumption of the sample or sample dilution (step 4) must be carried out in addition to a control measurement (step 2) and the actual measurement of nitrification inhibition of the sample or sample dilution (step 5), which is taken into consideration during the calculation of the end result.*

Recommended Measuring Sequence **with** Calculation of the Sample's Oxygen Self-Consumption:
C → SC-S → NI-S → C → SC-S → NI-S → C → SC-S → NI-S → C → …

Recommended Measuring Sequence **without** Calculation of the Sample's Oxygen Self-Consumption:
C → NI-S → NI-S → C → NI-S → NI-S → C → NI-S → NI-S → C → …

C = Control measurement (step 2)
SC-S = Self-consumption of the sample or sample dilution (step 4)
NI-S = Nitrification inhibition of the sample or sample dilution (step 5)

Step 1: Preparation of the nitrifying bacteria (Reagent *A-Tox* R2 und *N-Tox* R2)

Prepare reagents *A-Tox* R2 and *N-Tox* R2 for use in the test in accordance with the instructions on the leaflets enclosed with the respective reagent sets. Pay attention to the relevant notes!

Step 2: Control

1. Fit electrode adapter to O2-electrode.* Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
2. **Shake reagent *A-Tox* R1** vigorously for 30 s** to enrich the oxygen content, then fill the **reaction vessel** with **reagent *A-Tox* R1**** until it overflows, **avoiding air bubbles** (approx. 7 – 8 mL).
3. Carefully insert O_2-electrode with fitted electrode adapter into the reaction vessel until it is sealed air-tight and free of air bubbles (surplus medium overflows). **Stir** this preparation on the magnetic stirrer for approx. **1 – 2 min** until the meter indicates a constant oxygen level.
   Make sure there are no air-bubbles in the entire test mixture!
4. In the meantime, wet the entire surface of the electrode adapter and in particular, the two small injection holes with distilled water (e.g. using a squeeze bottle), to ensure an air-tight seal.
5. Remove reactivated reagents ***A-Tox*** R2 and ***N-Tox*** R2 (see step 1) from the refrigerator and homogenize by shaking briefly. Then add 100 µL of reagent ***A-Tox*** R2 and **100 µL of reagent *N-Tox* R2** (Important! After adding *A-Tox* R2 and before adding *N-Tox* R2, rinse the microliter syringe thoroughly by drawing up distilled water several times!) via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe. Then return reagent *A-Tox* R2 to the refrigerator (> 6 °C) and reagent *N-Tox* R2 to the ice compartment.
6. After 2 min (and before adding reagents *A-Tox* R3 and *N-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the control O_{C0} (O_2-concentration of control at time t = 0 min).
   Important: In the 2 min. before reagent A-Tox R3 is pipetted and before N-Tox R3 is pipetted, rinse the microliter syringe thoroughly by drawing up distilled water several times!
7. Now **add 100 µL of reagent *A-Tox* R3** and **100 µL of reagent *N-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe.
8. **After 10 min, read** and record the **oxygen concentration** in the control O_{C10} (O_2-concentration of control at time t = 10 min).

Step 3: Sample Preparation

1. In case of substantially cloudy samples, first carry out non-sterilizing preliminary filtration using standard (folded) filters, by centrifuging or comparable methods.
2. Set the pH value of the sample to **pH 7.8 + 0.2**, using 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl.
3. Fine filter 20 mL sample using CHROMAFIL® membrane filters, single-use, unsterile, pore size 0.45 µm (REF 91652) to remove the largest parts of the naturally present microflora, which can falsify the results.
4. Place **16 mL finely filtered sample solution** and **4 mL reagent *A-Tox* R4***** in a suitable container (e.g. suitably sized beaker).
5. Mix this mixture well and shake hard for 30 s' to aerate. Then use as **sample solution** for calculating the oxygen self-consumption of the sample (step 4) or for calculating the nitrification inhibition (step 5).

Step 4: Oxygen self-consumption of the sample

Note: *For* ***not*** *oxygen self-consuming samples, step 4 can be skipped. While evaluating the test results and calculating the nitrification inhibition, the variable* ***Δ OSC-S = 0*** *is used!*

1. Fit electrode adapter to O_2-electrode.* Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
2. Fill the reaction vessel with the **sample solution, pH 7.8** from step 3 to the overflow point **without air bubbles** (approx. 7 – 8 mL).
3. Carefully insert O_2-electrode with fitted electrode adapter into the reaction vessel until it is sealed air-tight and free of air bubbles (surplus medium overflows). **Stir** this preparation on the magnetic stirrer for approx. **1 – 2 min** until the meter indicates a constant oxygen level.
   Make sure there are no air-bubbles in the entire test mixture!
4. In the meantime, wet the entire surface of the electrode adapter and in particular, the two small injection holes with distilled water (e.g. using a squeeze bottle), to ensure an air-tight seal.

   Important: Reagents *A-Tox* R2 and *N-Tox* R2 are not added!
5. **After 2 min** (and before adding reagent *A-Tox* R3 and *N-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{SC-S0} (O_2-concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 0 min).
6. Then **immediately add 100 µL of reagent *A-Tox* R3** via the small injection hole of the electrode adapter using a microliter syringe. Afterwards, rinse the syringe thoroughly several times with distilled water and add 100 µL *N-Tox* R3.
7. **After 10 min**, read and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{SC-S10} (O_2-concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 10 min).

Step 5: Nitrification inhibition of the sample

1. Fit electrode adapter to O_2 electrode. Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
2. Fill the reaction vessel with the **sample solution, pH 7.8** from step 3 to the overflow point **without air bubbles** (approx. 7 – 8 mL).
3. Carefully insert O_2-electrode with fitted electrode adapter into the reaction vessel until it is sealed air-tight and free of air bubbles (surplus medium overflows). **Stir** this preparation on the magnetic stirrer for approx. **1 – 2 min** until the meter indicates a constant oxygen level. **Make sure there are no air-bubbles in the entire test mixture!**
4. In the meantime, wet the entire surface of the electrode adapter and in particular, the two small injection holes with distilled water (e.g. using a squeeze bottle), to ensure an air-tight seal.
5. Take reactivated reagent *A-Tox* R2 and *N-Tox* R2 out of the refrigerator or freezer compartment and first homogenize it by briefly shaking it. Then **add 100 µL of reagent *A-Tox* R2** and **100 µL of reagent *N-Tox* R2** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe. Return reagent *A-Tox* R2 to the refrigerator (> 6 °C) and reagent *N-Tox* R2 to the ice compartment.
6. After 2 min (and before adding reagents *A-Tox* R3 and *N-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{NI-S0} (O_2-concentration of sample preparation for determination of nitrification inhibition at time t = 0 min). ***Important: Rinse microliter syringe thoroughly by drawing up distilled water several times in the course of the 2 min and before reagents A-Tox R3 and N-Tox R3 are pipetted!***
7. Now **add 100 µL of reagent *A-Tox* R3******* and **100 µL of reagent *N-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe.
8. **After 10 min, read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{NI-S10} (O_2-concentration of sample preparation for determination of nitrification inhibition at time t = 10 min).

Step 6: Evaluation

(1) Oxygen consumption in the control: $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$

(2) Oxygen self-consumption of the sample: ΔO_{SC-S}* $= O_{SC-S0} - O_{SC-S10}$

(3) Oxygen consumption in sample preparation for determination of nitrification inhibition: $\Delta O_{NH-S} = O_{NI-S0} - O_{NI-S10}$

* $\Delta O_{SC-S} = 0$, if there is no oxygen self-consumption of the sample

Corrected oxygen consumption of the sample preparation taking oxygen self-consumption in consideration:
$\Delta O_S = \Delta O_{NI-S} - \Delta O_{SC-S}$

Final result: % inhibition of total nitrification = [(ΔO_C - ΔO_S) : ΔO_C] x 100

For evaluation purposes, we recommend using the evaluation sheet provided on the back of these instructions for use. Please feel free to copy this sheet for your own personal use.

* For precise information on fitting the electrode adapter to the oxygen electrode, please refer to the instruction leaflet enclosed with the "Starter Set for BioFix® Nitrification Inhibition Tests" (REF 970101).
** Alternatively, reagent *N-Tox* R1 may be used.
*** Alternatively, reagent *N-Tox* R4 may be used.
**** Important! After adding *A-Tox* R2 and before adding *N-Tox* R2, rinse the microliter syringe thoroughly by drawing up distilled water several times!
***** Important! After adding *A-Tox* R3 and before adding *N-Tox* R3, rinse the microliter syringe thoroughly several times with distilled water!

Interpretation of Results:
The inhibition values obtained can be interpreted in the following way:

0 – 10 % inhibition	Sample does not inhibit nitrification
10 – 20 % inhibition	Sample may inhibit nitrification
20 – 80 % inhibition	Sample does inhibit nitrification
> 80 % inhibition	Dilute sample and test again

As a further method for comparing and estimating the obtained inhibition data at different sample times or from different locations, which is independent of the standards, the result can also be given as **G_{NI}-Value** according to results of other biotoxicity tests (e.g. luminescent bacteria test according to DIN EN ISO 11348). This is defined as the reciprocal of the first dilution of the sample, that causes an nitrification inhibition of less than 20 %.
Example: If 35 % inhibition is obtained at a 1 + 1 dilution of a sample and a 15 % inhibition at a 1 + 3 dilution, in this case the G_{NI}-Value would be G_{NI} = 4.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germany
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Evaluation sheet for Special Application *A/N-Tox* Screening test

en

Date of analysis: _____ **Name of analyst:** _____

Control (Step 2)			Sample Measurement									Results
			Sample Name	Self-Consumption (Step 4)			Nitrification Inhibition (Step 5)			Corrected O_2-Consumption		
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{SC-S0} [mg/L]	O_{SC-S10} [mg/L]	ΔO_{SC-S} [mg/L] = $O_{SC-S0} - O_{SC-S10}$	O_{NI-S0} [mg/L]	O_{NI-S10} [mg/L]	ΔO_{NI-S} [mg/L] = $O_{NI-S0} - O_{NI-S10}$	ΔO_S [mg/L] = $\Delta O_{NI-S} - \Delta O_{SC-S}$		Inhibition [%] = [(ΔO_C - ΔO_S) : ΔO_C] x 100

O_{C0}: Oxygen concentration [mg/L] in control at the beginning of the test at time t_0

O_{C10}: Oxygen concentration [mg/L] in control at the end of the test after t = 10 min incubation

ΔO_C : Oxygen consumption [mg/L] in control after t = 10 min incubation

O_{SC-S0}: Oxygen concentration [mg/L] in sample preparation for determination of oxygen self-consumption at the beginning of the test at time t_0

O_{SC-S10}: Oxygen concentration [mg/L] in sample preparation for determination of oxygen self-consumption at the end of the test after t = 10 min incubation

ΔO_{SC-S}: Oxygen consumption [mg/L] in sample preparation for determination of oxygen self-consumption after t = 10 min incubation

O_{NI-S0}: Oxygen concentration [mg/L] in sample preparation for determination of nitrification inhibition at the beginning of the test at time t_0

O_{NI-S10}: Oxygen concentration [mg/L] in sample preparation for determination of nitrification inhibition at the end of the test after time t = 10 min incubation

ΔO_{NI-S}: Oxygen consumption [mg/L] in sample preparation for determination of nitrification inhibition after time t = 10 min incubation

APPLICATION PARTICULIERE 12.24 fr

REF 970001 / 970002

Test de Screening BioFix® *A/N-Tox*

Méthode :
Procédé ampérométrique pour la détermination de l'inhibition générale des substances contenues dans les échantillons quant à la nitrification microbienne par l'utilisation simultanée de groupes de bactéries oxydants à l'ammoniaque et au nitrite. Le test ne permet pas d'émettre une déclaration différenciée sur la question si tout spécialement le degré oxydation à l'ammoniaque ou au nitrite est inhibé. L'indication des résultats a lieu en tant que % d'inhibition de la consommation d'oxygène dans la solution d'échantillonnage par comparaison à un contrôle non inhibé. Les kits de réactifs « BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *A-Tox* » (REF 970001) et « BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *N-Tox* » (REF 970002) sont nécessaires à l'accomplissement du test.

Domaine de mesure :	**0 – 100 % d'inhibition**
Temps de réaction :	**10 min**
Température de réaction :	**température ambiante**

Exécution :
Accessoires nécessaires : BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *A-Tox* (REF 970001), BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *N-Tox* (REF 970002), Starter Set pour BioFix® Tests d'Inhibiteurs de Nitrification (REF 970101), CHROMAFIL® filtres jetables, non stériles, taille des pores de 0,45 µm (REF 91652), l'appareil de mesure de l'oxygène, le mélangeur magnétique, le support à pinces, les pipettes à course de piston avec pointes

Avant l'accomplissement du test, lire attentivement les indications spécifiées dans les fiches explicatives jointes du kit de test BioFix®** Test d'Inhibition de Nitrification A-Tox et N-Tox et les respecter impérativement !

Au cours d'une série de mesures, il est recommandé d'effectuer une nouvelle mesure de contrôle au plus tard toutes les deux mesures d'échantillon (détermination de la demande en oxygène de l'échantillon ou détermination de l'inhibition de la nitrification de l'échantillon) !

Etant donné que ce test rapide est fondé sur le principe de mesure de l'oxygène comme ordre de grandeur, il est possible que des ***échantillons contenant des matières consommatrices d'oxygène*** *faussent les résultats de mesure et recouvrent potentiellement les effets inhibiteurs de la nitrification. Afin de compenser de tels effets consommateurs d'oxygène, il est également nécessaire d'effectuer, outre une mesure de contrôle (étape de travail 2) et la mesure véritable de l'inhibition de la nitrification de l'échantillon ou de l'échantillon dilué (étape de travail 5), une détermination de la demande en oxygène de l'échantillon ou de l'échantillon dilué (étape de travail 4), qui est incluse au calcul du résultat final.*

Ordre de mesure recommandé **avec** détermination de la demande en oxygène de l'échantillon :
C → DE → IN-E → C → DE → IN-E → C → DE → IN-E → C → …

Ordre de mesure recommandé **sans** détermination de la demande en oxygène de l'échantillon :
C → IN-E → IN-E → C → IN-E → IN-E → C → IN-E → IN-E → C → …

C = Mesure de contrôle (étape de travail 2)
DE = Demande de l'échantillon ou de l'échantillon dilué contenant des matières consommatrices d'oxygène (étape de travail 4)
IN-E = Inhibition de la nitrification de l'échantillon ou de l'échantillon dilué (étape de travail 5)

Etape de travail 1 : Préparation des bactéries nitrificantes (Réactif *A-Tox* R2 et *N-Tox* R2)

Préparer les réactifs *A-Tox* R2 et *N-Tox* R2 conformément aux instructions des fiches explicatives jointes des différents kits de réactifs pour l'utilisation durant le test. Suivre les remarques données ici !

Etape de travail 2 : Contrôle

1. Placer l'adaptateur pour électrodes sur électrode O_2.* Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
2. **Agiter** vigoureusement le **réactif *A-Tox* R1**** pour enrichissement en oxygène durant **30 s**, puis remplir le récipient de réaction jusqu'au trop-plein en **réactif *A-Tox* R1**** **sans formation de bulles d'air** (env. 7 – 8 mL).
3. Immerger l'électrode O_2 avec adaptateur pour électrode introduit avec précaution dans le récipient de réaction jusqu'à fermeture étanche à l'air et exempte de bulles d'air (l'agent superflu déborde). **Mélanger** cette préparation durant **1 à 2 min** sur le mélangeur magnétique jusqu'à ce qu'une valeur constante d'oxygène soit indiquée par l'appareil de mesure. **Veiller absolument à l'absence de bulles de l'ensemble de la solution de test !**
4. Entre-temps, humidifier avec de l'eau distillée (par ex. à l'aide d'un flacon vaporisateur) la surface entière de l'adaptateur d'électrode et en particulier les deux entailles jusqu'à la fermeture hermétique.
5. Enlever les réactifs réactivés *A-Tox* R2 et *N-Tox* R2 (voir étape de travail 1) du compartiment de réfrigération (*A-Tox* R2) et de congélation(*N-Tox* R2) et procéder dans un premier temps à une homogénéisation en l'agitant brièvement. Ensuite, **addition** de **100 µL de réactif *A-Tox* R2** et **addition** de **100 µL de réactif *N-Tox* R2** (Important ! Après avoir ajouté le réactif *A-Tox* R2 et avant d'ajouter le réactif *N-Tox* R2, bien rincer la seringue à micro-litre en la remplissant plusieurs fois d'eau distillée !) par la petite percée d'injection de l'adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre). Ensuite, replacer immédiatement les réactifs dans le compartiment de réfrigération (*A-Tox* R2 > 6 °C) et dans le compartiment de congélation (*N-Tox* R2).
6. **Après 2 min** (et avant d'ajouter les réactifs *A-Tox* R3 et *N-Tox* R3 !), relever et noter la **concentration d'oxygène** de la préparation de contrôle O_{C0} (concentration en O_2 de la préparation de contrôle au moment t = 0 min).
   Important : Durant les 2 minutes, avant de pipeter les réactifs A-Tox R3 et N-Tox R3, bien rincer la seringue à micro-litre en la remplissant plusieurs fois d'eau distillée !
7. Ensuite, **ajouter immédiatement 100 µL de réactif *A-Tox* R3** et **100 µL de réactif *N-Tox* R3** par la petite percée d'injection de l'adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre.
8. **Après 10 min, relever** et noter la **concentration d'oxygène** de dans la préparation de contrôle O_{C10} (concentration en O_2 de la préparation de contrôle au moment t = 10 min).

Etape de travail 3 : Préparation de l'échantillonnage

1. Lors d'échantillons fortement troublés, réaliser dans un premier temps un filtrage préalable non stérile en ayant recours aux filtres (à plis) couramment proposés dans le commerce), par centrifugation ou des méthodes similaires.
2. Régler la valeur pH avec 0,1 N NaOH ou 0,1 HCl sur **pH 7,8 ± 0,2**.
3. **Filtrer finement 20 mL de l'échantillon** à l'aide de CHROMAFIL® filtres jetables, non stériles, taille des pores 0,45 µm (REF 91652) (afin d'éliminer une grande partie de la microflore présente naturellement, qui est susceptible de fausser le résultat de la mesure).
4. Verser dans un récipient adéquat (par ex. un bécher de taille suffisante) **16 mL de la solution de l'échantillon filtrée finement** et **4 mL de réactif *A-Tox* R4**.***
5. Bien mélanger cette préparation et secouer fortement pendant 30 s pour l'enrichir en oxygène. Puis utiliser comme **solution d'échantillon** pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon (étape de travail 4) ou pour déterminer l'inhibition de nitrification (étape de travail 5).

Etape de travail 4 : Demande en oxygène de l'échantillon

Remarque : *En présence d'échantillons* ***non*** *consommateurs d'oxygène, on peut renoncer à l'étape de travail 4. Dans le cadre de l'analyse du test et du calcul de l'inhibition de nitrification, on utilise alors la variable* $\Delta O_{DE} = 0$ *!*

1. Placer l'adaptateur pour électrodes sur électrode O_2.* Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
2. Remplir le récipient de réaction avec la **solution d'échantillon** jusqu'à ce qu'il déborde **sans former de bulles d'air, pH 7,8** de l'étape de travail 3 (env. 7 – 8 mL).
3. Immerger l'électrode O_2 avec adaptateur pour électrode introduit avec précaution dans le récipient de réaction jusqu'à fermeture étanche à l'air et exempte de bulles d'air (l'agent superflu déborde). **Mélanger** cette préparation durant **1 à 2 min** sur le mélangeur magnétique jusqu'à ce qu'une valeur constante d'oxygène soit indiquée par l'appareil de mesure. **Veiller absolument à l'absence de bulles de l'ensemble de la solution de test !**
4. Entre-temps, humidifier avec de l'eau distillée (par ex. à l'aide d'un flacon vaporisateur) la surface entière de l'adaptateur d'électrode et en particulier les deux entailles jusqu'à la fermeture hermétique.

Important : Ne pas ajouter de réactif *A-Tox* R2 et *N-Tox* R2 !

5. **Après 2 min** (et avant d'ajouter le réactif *A-Tox* R3 et *N-Tox* R2), **relever** et noter la **concentration d'oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon O_{DE0} (concentration en O_2 de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon au moment t = 0 min).
6. Ensuite, ajouter ***immédiatement*** **100 µL de réactif *A-Tox* R3** par la petite percée d'injection de l'adaptateur pour électrodes au moyen d'une seringue à micro-litre, puis bien rincer cette seringue plusieurs fois à l'eau distillée et ajouter 100 µL de réactif *N-Tox* R3.
7. **Après 10 min**, **relever** et noter la **concentration d'oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon O_{DE10} (concentration en O_2 de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon au moment t = 10 min).

Etape de travail 5 : Inhibition de la nitrification de l'échantillon

1. Placer l'adaptateur pour électrodes sur électrode O_2.* Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
2. Remplir le récipient de réaction avec la **solution d'échantillon** jusqu'à ce qu'il déborde **sans former de bulles d'air, pH 7,8** de l'étape de travail 3 (env. 7 – 8 mL).
3. Immerger l'électrode O_2 avec adaptateur pour électrode introduit avec précaution dans le récipient de réaction jusqu'à fermeture étanche à l'air et exempte de bulles d'air (l'agent superflu déborde). **Mélanger** cette préparation durant **1 à 2 min** sur le mélangeur magnétique jusqu'à ce qu'une valeur constante d'oxygène soit indiquée par l'appareil de mesure. **Veiller absolument à l'absence de bulles de l'ensemble de la solution de test !**
4. Entre-temps, humidifier avec de l'eau distillée (par ex. à l'aide d'un flacon vaporisateur) la surface entière de l'adaptateur d'électrode et en particulier les deux entailles jusqu'à la fermeture hermétique.
5. Sortir les réactifs *A-Tox* R2 et *N-Tox* R2 réactivés du compartiment réfrigération ou congélation et les agiter brièvement pour les homogénéiser. Ensuite, addition de **100 µL de réactif *A-Tox* R2** et **addition** de 1**00 µL de réactif *N-Tox* R2** par la petite percée d'injection de l'adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre). Ensuite, replacer immédiatement les réactifs dans le compartiment de réfrigération (*A-Tox* R2 > 6 °C) et dans le compartiment de congélation (*N-Tox* R2).
6. **Après 2 min** (et avant d'ajouter les réactifs *A-Tox* R3 et *N-Tox* R3 !), **relever** et noter la **concentration d'oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon O_{IN-E0} (concentration en O2 de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon au moment t = 0 min).
   Important : Durant les 2 min et avant de pipeter les réactifs A-Tox R3 et N-Tox R3, bien rincer la seringue à micro-litre en faisant passer plusieurs fois de l'eau distillée !
7. Ensuite, **ajouter immédiatement 100 µL de réactif *A-Tox* R3***** et **100 µL de réactif *N-Tox* R3** par la petite percée d'injection de l'adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre.
8. **Après 10 min, relever** et noter la **concentration d'oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon O_{IN-E10} (concentration en O2 de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon au moment t = 10 min).

Etape de travail 6 : Evaluation

(1) Consommation d'oxygène de la préparation de contrôle : $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$

(2) Demande d'oxygène de l'échantillon : $\Delta O_{DE*} = O_{DE0} - O_{DE10}$

(3) Consommation d'oxygène de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon : $\Delta O_{NI-E} = O_{IN-E0} - O_{IN-E10}$

* $\Delta O_{DE} = 0$, en cas d'absence de demande en O_2 de l'échantillon

Consommation corrigée en oxygène dans la préparation de l'échantillon en considérant la demande en oxygène :
$\Delta O_E = \Delta O_{IN-E} - \Delta O_{DE}$

Résultat de test : % d'inhibition générale = $[(\Delta O_C - \Delta O_E) : \Delta O_C] \times 100$

En vue de l'évaluation, nous recommandons l'utilisation de la fiche d'évaluation ci-jointe au verso de la présente notice d'utilisation. Elle peut être polycopiée sans problème dans le but d'une propre utilisation.

* Pour des indictions précises sur l'introduction de l'adaptateur pour électrodes à l'électrode pour oxygène, veuillez consulter la fiche jointe explicative du « Starter set pour BioFix® Tests d'Inhibiteurs de Nitrification » (REF 970101).
** Il est possible d'utiliser comme alternative le réactif *N-Tox* R1.
*** Il est possible d'utiliser comme alternative le réactif *N-Tox* R4.
**** Important ! Après avoir ajouté le réactif *A-Tox* R2 et avant d'ajouter le réactif *N-Tox* R2, bien rincer la seringue à micro-litre en la remplissant plusieurs fois d'eau distillée !
***** Important ! Après avoir ajouté le réactif *A-Tox* R3 et avant d'ajouter le réactif *N-Tox* R3, bien rincer la seringue à micro-litre plusieurs fois à l'eau distillée !

Interprétation des résultats des test :
Les valeurs d'inhibition obtenues peuvent être interprétées de la manière suivante :

0 – 10 % d'inhibition	échantillon sans inhibition de nitrification
10 – 20 % d'inhibition	échantillon avec inhibition de nitrification potentielle
20 – 80 % d'inhibition	échantillon avec inhibition de nitrification
> 80 % d'inhibition	diluer l'échantillon et recommencer le test

Une autre possibilité indépendante de toute norme permettant de comparer et d'apprécier les données d'inhibition à des moments différents de prélèvement d'échantillon ou entre divers lieux consiste à exprimer également le résultat comme **valeur G_{IN}** en référence à la donnée de résultats d'autres tests de biotoxicité (par exemple le test de bactéries luminescentes d'après la norme DIN EN ISO 11348). Cette valeur est définie comme valeur inverse de premier degré de dilution de l'échantillon chez lequel l'inhibition de la nitrification est d'abord inférieure à 20 %.
Exemple : Si sur un échantillon dilué à 1 + 1 on mesure une inhibition de 35 % et si sur un échantillon dilué à 1 + 3 on mesure une inhibition de 15 %, alors dans ce cas la valeur G_{IN} serait = 4.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Allemagne
Tél. : +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***
France : MACHEREY-NAGEL SAS · 1, rue Gutenberg · BP135 · 67720 Hoerdt · France
Tél. : 03 88 68 22 68 · sales-fr@mn-net.com
MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Formulaire d'évaluation pour application particulière du test de screening *A/N-Tox* fr

Date de l'analyse : _____ **Nom de l'exécutant :** _____

Contrôle (Etape de travail 2)			Mesure de l'échantillonnage								Résultat
			Désignation de l'échantillon	Demande d'oxygène (Etape de travail 4)			Inhibition de nitrification (Etape de travail 5)			Consommation corrigé en O_2	
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{DE0} [mg/L]	O_{DE10} [mg/L]	ΔO_{DE} [mg/L] = $O_{DE0} - O_{DE10}$	O_{IN-E0} [mg/L]	O_{IN-E10} [mg/L]	ΔO_{IN-E} [mg/L] = $O_{IN-E0} - O_{IN-E10}$	ΔO_E [mg/L] = $\Delta O_{IN-E} - \Delta O_{DE}$	Inhibition [%] = $[(\Delta O_C - \Delta O_E) : \Delta O_C] \times 100$

O_{C0} : Concentration en oxygène [mg/L] dans la préparation contrôle au moment t_0 au commencement de l'essai

O_{C10} : Concentration en oxygène [mg/L] dans la préparation contrôle d'après t = 10 min d'incubation

ΔO_C : Consommation en oxygène [mg/L] dans la préparation contrôle d'après t = 10 min d'incubation

O_{DE0} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon au moment t_0 au commencement de l'essai

O_{DE10} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon d'après t = 10 min d'incubation

ΔO_{DE} : Consommation en oxygène [mg/L] de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l'échantillon d'après t = 10 min d'incubation

O_{IN-E0} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon au moment t_0 au commencement de l'essai

O_{IN-E10} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon d'après t = 10 min d'incubation

ΔO_{IN-E} : Consommation en oxygène [mg/L] de la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon d'après t = 10 min d'incubation

APLICACIÓN ESPECIAL 12.24 es

REF 970001 / 970002

Screeningtest BioFix® *A/N-Tox*

Método:
Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibidor general de productos contenidos en pruebas procedentes de la nitrificación microbiana por aplicación simultánea de cepas bacterianas oxidantes de amoniaco y nitritos. La prueba no permite ninguna afirmación diferenciada de si se inhibió especialmente el nivel de oxidación amoniacal o por nitritos. Los datos del resultado se hace como % de inhibición del consumo de oxígeno en la solución de prueba en comparación a la de un control no inhibido. Para la realización de la prueba se necesitarán los juegos de reactivos „BioFix® Test de Inhibición a la Nitrificación *A-Tox*" (REF 970001) y „BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *N-Tox*" (REF 970002).

Rango:	**0 – 100 % de inhibición**
Tiempo de reacción:	**10 min**
Temperatura de reacción:	**temperatura ambiental**

Procedimiento:
Accesorios requeridos: BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *A-Tox* (REF 970001), BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *N-Tox* (REF 970002), Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación (REF 970101), CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de abertura de 0,45 µm (REF 91652), medidor de oxígeno, agitador magnético, soporte con fijaciones, pipetas de pistón aspirante con puntas

¡Antes de efectuar una prueba lea detenidamente y respete las instrucciones indicadas en el prospecto acompañante a los juegos de reactivos BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación A-Tox y N-Tox!

Se recomienda, para cada segunda medición de la serie (determinación de la tasa de consumo de oxígeno o de la inhibición de la nitrificación), realizar una ¡nueva medición de control!

En función del principio de la medición de oxígeno aplicado en este test rápido, demostrar que **el contenido consumidor de oxígeno** puede conducir a resultados falsos o disfrazar efectos inhibidores de la nitrificación. Para compensar tales efectos consumidores de oxígeno es necesaria, además de la medición de control (Paso de trabajo 2) y de la inhibición a la nitrificación de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 5), la determinación de la tasa de consumo de oxígeno de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 4), la cual entrará en el cálculo del resultado final.

Procedimiento recomendado **con** la determinación de la tasa de consumo de oxígeno de la prueba:
C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → …

Procedimiento recomendado **sin** la determinación de la tasa de consumo de oxígeno de la prueba:
C → IN-P → IN-P → C → IN-P → IN-P → C → IN-P → IN-P → C → …

C = medición de control (Paso de trabajo 2)
CO-P = consumo de oxígeno de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 4)
IN-P = inhibición a la nitrificación de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 5)

Paso de trabajo 1: Preparación de bacterias nitrificantes (Reactivos *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2)

Los reactivos *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2 prepárelos de acuerdo con las instrucciones del prospecto acompañante en el correspondiente juego de reactivos. ¡Observe las respectivas instrucciones!

Paso de trabajo 2: Control

1. Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O_2.* Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
2. **Agite fuertemente el reactivo *A-Tox* R1**** para el enriquecimiento de oxígeno durante **30 s** y a continuación llene el recipiente de reacción hasta su rebose **libre de burbujas** con el reactivo ***A-Tox* R1**** (aprox. 7 – 8 mL).
3. Introduzca el electrodo O_2 con el adaptador del electrodo enchufado y con cuidado en el recipiente de reacción hasta que quede cubierto hermético al aire y sin burbujas (el medio sobrante rebosa). Este preparado **agítelo** durante aprox. **1 – 2 min** sobre el agitador magnético hasta que se indique un valor de oxígeno constante por el aparato medidor. **¡Observe bien que no pueden estar presentes burbujas de aire en la prueba!**
4. Entretanto, moje toda la superficie del adaptador y, especialmente, los dos huecos, con agua destilada (p. ej., utilizando un frasco de lavado), impidiendo el contacto con aire.
5. Saque el reactivo reactivado del frigorífico o congelador *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2 y homogeneice por agitación breve. A continuación añada **100 µL de reactivo *A-Tox* R2 y 100 µL de reactivo *N-Tox* R2** (¡Importante! Después de añadir *A-Tox* R2 y antes de añadir *N-Tox* R2, lave meticulosamente la jeringa de microlitros aspirando varias veces agua destilada.) a través del pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo ambos reactivos en frigorífico (*A-Tox* R2 > 6 °C) o en congelador (*N-Tox* R2).
6. **Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos *A-Tox* R3 y *N-Tox* R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de control O_{C0} (concentración de O_2 del preparado de control en el momento t = 0 min).
Importante: Durante los 2 minutos anteriores al pipeteado del reactivo A-Tox R3 y antes de pipetear N-Tox R3, lave meticulosamente la jeringa de microlitros varias veces con agua destilada.
7. A continuación **adición inmediata de 100 µL de reactivo *A-Tox* R3 y 100 µL de reactivo *N-Tox* R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
8. **Lea después de 10 min** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de control O_{C10} (Concentración de O_2 del preparado de control en el momento = 10 min).

Paso de trabajo 3: Preparaciones para la prueba

1. En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa no estéril con la ayuda de los filtro (plegables) comerciales normales, por centrifugación y métodos similares.
2. Ajuste el valor del pH de la prueba con la ayuda de 0,1 N NaOH ó 0,1 N HCl al **pH 7,8 ± 0,2**.
3. **Microfiltre 20 mL de la prueba** utilizando CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de las aberturas de 0,45 µm (REF 91652), para apartar la mayor parte de la microflora natural ya existente que puede conducir a resultados falsos.
4. Adicione a un recipiente apropiado (p. ej., un recipiente químico de tamaño suficiente)
16 mL de la prueba microfiltrada y
4 mL del reactivo *A-Tox* R4.***
5. Mezcle la prueba y agítela bien por 30 s.
Enseguida, utilice esta solución como **solución prueba** para la determinación de la tasa de consumo de oxígeno (Paso de trabajo 4) y de la inhibición a la nitrificación (Paso de trabajo 5).

Paso de trabajo 4 : Consumo de oxígeno de la prueba

***Observación:** En caso de pruebas **no** consumidoras de oxígeno, se puede dispensar el paso de trabajo 4. ¡En la evaluación del test y en el cálculo de la inhibición a la nitrificación será $\Delta O_{CO-P} = 0$!*

1. Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O_2.* Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
2. Llene el recipiente de reacción con la **solución prueba (pH 7,8)** del paso de trabajo 3 (aprox. 7 – 8 mL), **sin la formación de burbujas de aire**.
3. Introduzca el electrodo O_2 con adaptador del electrodos enchufado y con cuidado en el recipiente de reacción hasta que quede cubierto hermético al aire y libre de burbujas (rebosa el medio sobrante). Este preparado **agítelo** durante aprox. **1 – 2 min** en el agitador magnético hasta que indique el aparato medidor un valor de oxígeno constante. **¡Observe bien que no pueden estar presentes burbujas de aire en la prueba!**
4. Entretanto, moje toda la superficie del adaptador y, especialmente, los dos huecos, con agua destilada (p. ej., utilizando un frasco de lavado), impidiendo el contacto con aire.
Importante: ¡No adición de los reactivos *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2!
5. **Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos *A-Tox* R3 y *N-Tox* R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de la prueba O_{CO-P0} (Concentración de O_2 en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t = 0 min).
6. A continuación, añada **inmediatamente 100 µL de reactivo *A-Tox R3*** a través del pequeño orificio de inyección del adaptador del electrodo con una jeringa de microlitros; después, enjuague meticulosamente la jeringa varias veces con agua destilada y añada 100 µL de *N-Tox* R3.
7. **Lea después de 10 min** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de la prueba O_{CO-P10} (Concentración de O_2 en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t = 10 min).

Paso de trabajo 5: Inhibición a la nitrificación de la prueba

1. Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O2.* Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
2. Llene el recipiente de reacción con la solución prueba (pH 7,8) del paso de trabajo 3 (aprox. 7 – 8 mL), sin la formación de burbujas de aire.
3. Introduzca el electrodo O2 con adaptador del electrodos enchufado y con cuidado en el recipiente de reacción hasta que quede cubierto hermético al aire y libre de burbujas (rebosa el medio sobrante). Este preparado agítelo durante aprox. 1 – 2 min en el agitador magnético hasta que indique el aparato medidor un valor de oxígeno constante. **¡Observe bien que no pueden estar presentes burbujas de aire en la prueba!**
4. Entretanto, moje toda la superficie del adaptador y, especialmente, los dos huecos, con agua destilada (p. ej., utilizando un frasco de lavado), impidiendo el contacto con aire.
5. Extraiga el reactivo reactivado *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2 del refrigerador o de la nevera y homogeneícelo agitándolo brevemente. A continuación añada **100 µL de reactivo *A-Tox* R2** y **100 µL de reactivo *N-Tox* R2** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo ambos reactivos en frigorífico (*A-Tox* R2 > 6 °C) o en congelador (*N-Tox* R2).
6. **Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos *A-Tox* R3 y *N-Tox* R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de control O_{IN-P0} (concentración de O_2 del preparado de control en el momento t = 0 min).
Importante: ¡Durante los 2 min y antes de que pueda extraerse con la pipeta los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3 lave bien la jeringa de microlitro aspirando varias veces en agua destilada!
7. A continuación **adición inmediata de 100 µL de reactivo *A-Tox* R3***** y **100 µL de reactivo *N-Tox* R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
8. **Lea después de 10 min** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de control O_{IN-P10} (Concentración de O_2 del preparado de control en el momento = 10 min).

Paso de trabajo 6: Valoración

(1) Consumo de oxígeno en el preparado de control: $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$

(2) Consumo de oxígeno de la prueba: $\Delta O_{CO-P} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$

(3) Consumo de oxígeno en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en la prueba: $\Delta O_{IN-P} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$

* $\Delta O_{CO-P} = 0$, cuando no consta consumo de oxígeno en la prueba

Consumo de oxígeno corregido en la solución prueba, tomando en cuenta el consumo de oxígeno:
$$\Delta O_P = \Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$$

Resultado: % de inhibición de la nitrificación total = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

Para la valoración recomendamos la utilización de la hoja de valoración acompañante en el dorso de estas instrucciones de uso. Ésta puede copiarse para su propio uso.

* Las instrucciones exactas para el enchufe del adaptador de electrodos en el electrodo de oxígeno lo encontrará en el prospecto acompañante del „Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación" (REF 970101).
** Como alternativa, también se puede utilizar el reactivo *N-Tox* R1.
*** Como alternativa, también se puede utilizar el reactivo *N-Tox* R4.
**** ¡Importante! Después de añadir *A-Tox* R2 y antes de añadir *N-Tox* R2, lave meticulosamente la jeringa de microlitros aspirando varias veces agua destilada.
***** ¡Importante! Después de añadir *A-Tox* R3 y antes de añadir *N-Tox* R3, lave meticulosamente la jeringa de microlitros varias veces con agua destilada.

Interpretación de los resultados:
Los valores de inhibición se interpretan de la forma siguiente:

0 – 10 % de inhibición (también valores negativos)	Prueba no presenta inhibición a la nitrificación
10 – 20 % de inhibición	Prueba presenta inhibición a la nitrificación en potencia.
20 – 80 % de inhibición	Prueba presenta inhibición a la nitrificación
> 80 % de inhibición	Diluir prueba y repetir el test

Siendo otra alternativa independiente de las normas para la evaluación la comparación de valores de inhibición determinados en fechas o lugares de pruebas diferentes, el resultado puede ser informado como **valor G_{IN}**, usado también en tests de toxicidad biológica (p. ej., test de bacterias luminescentes, conforme DIN EN ISO 11348). Este se define por el valor recíproco del primer grado de dilución que presentará una inhibición inferior de 20 %.
Ejemplo: Si fuera determinada una inhibición de 35 % en la prueba diluida a 1 + 1, y una inhibición de 15 % en la prueba diluida a 1 + 3, sería el valor $G_{IN} = 4$.

.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valenciennner Str. 11 · 52355 Düren · Alemania
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Hoja de valoración Aplicación especial Screeningtest *A/N-Tox* es

Fecha de análisis: _____ **Nombre del realizador:** _____

Control (Paso de trabajo 2)			Medida de prueba									Resultado
			Denominación de la prueba	Consumo de oxígeno de la prueba (Paso de trabajo 4)			Inhibición de la nitrificación (Paso de trabajo 5)			Consumo de oxígeno corregido		
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{CO-P0} [mg/L]	O_{CO-P10} [mg/L]	ΔO_{CO-P} [mg/L] = $O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$	O_{IN-P0} [mg/L]	O_{IN-P10} [mg/L]	ΔO_{IN-P} [mg/L] = $O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$	ΔO_P [mg/L] = $\Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$		Inhibición [%] = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

O_{C0}: Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado de control en el momento t_0 al inicio del ensayo

O_{C10}: Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado de control después de t = 10 min de incubación

ΔO_C: Consumo de oxígeno [mg/L] en preparado de control después de t = 10 min de incubación

O_{CO-P0}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t_0 al inicio del ensayo

O_{CO-P10}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba después de t = 10 min de incubación

ΔO_{CO-P}: Consumo de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba después de t = 10 min de incubación

O_{IN-P0}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t_0 al inicio del ensayo

O_{IN-P10}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación después de t = 10 min de incubación

ΔO_{IN-P}: Consumo de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación después de t = 10 min de incubación

SPECIALE APPLICATIE 12.24

nl

REF 970001 / 970002

Screeningtest BioFix® *A/N-Tox*

Methode:
Amperometrische procedure voor de bepaling van de algemene remmende werking van monsterbestanddelen op de microbiële nitrificatie door gelijktijdige inzet van ammoniak- en nitrietoxiderende bacteriestammen. Bij deze test kan er geen gedifferentieerde uitspraak gedaan worden over het feit of in het bijzonder de ammoniak- of de nitrietoxidatietrap geremd wordt. De resultaten worden aangeduid als % remming van het zuurstofverbruik in de monsteroplossing in vergelijking met een ongeremde controle. Voor de uitvoering van de test zijn de reagentiasets "BioFix® Nitrificatieremtest A-Tox" (REF 970001) en "BioFix® Nitrificatieremtest *N-Tox*" (REF 970002) nodig.

Meetgebiet:	**0 – 100 % remming**
Reactietijd:	**10 min**
Reactietemperatuur:	**kamertemperatuur**

Procedure:
Benodigde hulpmiddelen: BioFix® Nitrificatieremtest A-Tox (REF 970001), BioFix® Nitrificatieremtest *N-Tox* (REF 970002), Starterset voor BioFix® Nitrificatieremtests (REF 970101), CHROMAFIL® wegwerpfilter onsteriel, poriegrootte 0,45 µm (REF 91652), zuurstofmeter, magneetroerder, statief met klemmen, zuigerpipetten met tap.

Voor de uitvoering van een test de aanwijzingen in de bijgevoegde gebruiksaanwijzingen van de testkits BioFix® Nitrificatieremtest A-Tox en N-Tox aandachtig en lezen en absoluut in acht nemen!

Er wordt aanbevolen binnen een metingreeks na ten laatste iedere tweede monstermeting (bepaling van de zuurstof-eigen-vertering van het monster resp. bepaling van de nitrificatieremming van het monster) weer een nieuwe controlemeting uitvoe-ren!

Op grond van deze snelle test als meetgrootte ten grondslag liggende principe van de zuurstofmeting kunnen **monsters met zuurstofverterende inhoudsstoffen** de meetresultaten vervalsen en potentiële nitrificatieremmende werkingen overdekken. Voor een compensatie van zulke zuurstofverterende effecten moet naast een controlemeting (arbeidsstap 2) en de eigenlijke meting van de nitrificatieremming van het monster resp. monsterverdunning (arbeidsstap 5) aanvullend een bepaling van de zuurstof-eigenvertering van het monster resp. monsterverdunning (arbeidsstap 4) worden uitgevoerd, waarmee bij de berekening van het eindresultaat rekening wordt gehouden.

Aanbevolen meetvolgorde met bepaling van de zuurstof-eigenvertering van het monster:
C → ZE-M → NR-M → C → ZE-M → NR-M → C → ZE-M → NR-M → C → …

Aanbevolen meetvolgorde zonder bepaling van de zuurstof-eigenvertering van het monster::
C → NR-M → NR-M → C → NR-M → NR-M → C → NR-M → NR-M → C → …

C = Controlemeting (arbeidsstap 2)
ZE-M = Zuurstof-eigenvertering van het monster resp. monsterverdunning (arbeidsstap 4)
NR-M = Nitrificatieremming van het monster resp. monsterverdunning (arbeidsstap 5)

Arbeidsstap 1: Voorbereiding van de nitrificerende bacteriën (Reagens *A-Tox* R2 en *N-Tox* R2)

De reagentia *A-Tox* R2 en *N-Tox* R2 voorbereiden voor testgebruik overeenkomstig de instructies in de bijgevoegde gebruiksaanwijzingen van de betreffende reagentiasets! De zich daar bevindende aanwijzingen in acht nemen!

Arbeidsstap 2: Controle

1. Elektrodeadapter op O2-elektrode steken.* Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
2. **Reagens *A-Tox* R1**** gedurende **30 s krachtig schudden** om het te verrijken met zuurstof en vervolgens het reactievat **zonderluchtbellenvorming** maximaal vullen met reagens ***A-Tox* R1**** (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het luchtdicht en zonder luchtbellenvorming afsluit (overtollig medium loopt over). Deze bereiding ca. **1 – 2 min roeren** op de magneetroerder tot het meetapparaat een constante zuurstofwaarde aanduidt.
Absoluut op luchtbellenvrijheid van de gehele testaanmenging letten!
4. Ondertussen het gehele oppervlak van de elektrode-adapter en vooral de beide steekboringen voor een luchtdichte afdichting met gedestilleerd water (bijv. met behulp van een spuitfles) bevochtigen.
5. Gereactiveerde reagens *A-Tox* R2 uit de koelkast en reagens *N-Tox* R2 uit het vriesvak nemen. De reagentia door kort schudden eerst homogeniseren. Vervolgens **100 µL reagens *A-Tox* R2** en **100 µL reagens *N-Tox* R2** (Belangrijk! Na toevoeging van A-Tox R2 en vóór toevoeging van *N-Tox* R2 de micrometerspuit goed spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!) toevoegen door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit. Vervolgens beide reagentia opnieuw koel (*A-Tox* R2 > 6 °C) resp. ijskoud (*N-Tox* R2) bewaren.
6. **Na 2 min** (en voor de toevoeging de reagentia *A-Tox* R3 en *N-Tox* R3!) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de controlebereiding O_{C0} (O_2-concentratie van de controlebereiding op het tijdstip t = 0 min).
Belangrijk: Tijdens de 2 min en alvorens de reagentia A-Tox R3 en N-Tox R3 gepipetteerd worden, de micrometerspuit goed spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!
7. Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *A-Tox* R3** en **100 µL reagens *N-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit.
8. **Na 10 min aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de controlebereiding O_{C10} (O_2-concentratie van de controlebereiding op het tijdstip t = 10 min).

Arbeidsstap 3: Monstervoorbereiding

1. Bij sterk vertroebelde monsters eerst een niet-steriele voorfiltratie uitvoeren met behulp van een gangbare (vouw-) filter, door centrifugering of vergelijkbare methoden.
2. De pH-waarde van de monster met behulp van 0,1 N NaOH resp. 0,1 N HCl instellen op **pH 7,8 ± 0,2**.
3. **20 mL monster** met behulp van CHROMAFIL® wegwerpfilters, onsteriel, poriegrootte 0,45 µm (REF 91652) **fijnfiltreren** (voor de verwijdering van het grootste deel van de natuurlijkzijdige reeds voorhanden microflora, dat het meetresultaat kan vervalsen).
4. Men geeft in een geschikt vat (bijv. beker van toereikende grootte)
16 mL fijn gefiltreerde monsteroplossing en
4 mL reagens *A-Tox* R4.***
5. Deze aanmenging goed mengen en voor een zuurstofverrijking voor 30 s krachtig schudden.
Aansluitend als **monsteroplossing** voor de bepaling van de zuurstof-eigenvertering van het monster (arbeidsstap 4) resp. voor de nitrificatieremming (arbeidsstap 5) inzetten.

Arbeidsstap 4: Zuurstof – eigenvertering van het monster

Aanwijzing: *Bij niet-zuurstofverterende monsters kan men van arbeidsstap 4 afzien. In het kader van de testanalyse en berekenin van de nitrificatieremming wordt in dit geval de variabele* $\Delta O_{ZE-M} = 0$ *gezet!*

1. Elektrodeadapter op O_2-elektrode steken.* Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
2. Reactievat **zonder luchtbellenvorming** maximaal vullen met **monsteroplossing pH 7,8** (ca. 7 – 8 mL) uit arbeidsstap 3.
3. O_2-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het luchtdicht en zonder luchtbellenvorming afsluit (overtollig medium loopt over). Deze bereiding ca. **1 – 2 min roeren** op de magneetroerder tot het meetapparaat een constante zuurstofwaarde aanduidt.
Absoluut op luchtbellenvrijheid van de gehele testaanmenging letten!
4. Ondertussen het gehele oppervlak van de elektrode-adapter en vooral de beide steekboringen voor een luchtdichte afdichting met gedestilleerd water (bijv. met behulp van een spuitfles) bevochtigen.

Belangrijk: Niet toevoegen van de reagentia *A-Tox* R2 en *N-Tox* R2!

5. **Na 2 min** (en voor de toevoeging de reagentia *A-Tox* R3 en *N-Tox* R3!) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing O_{ZE-M0} (O_2-concentratie in de eigenverteringsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 0 min).
6. Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *A-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit, deze daarna meerdere keren goed spoelen met gedestilleerd water en toevoeging van 100 µL *N-Tox* R3.
7. **Na 10 min aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing O_{ZE-M10} (O_2-concentratie in de eigenverteringsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 10 min).

Arbeidsstap 5: Nitrificatieremming van het monster

1. Elektrodeadapter op O_2-elektrode steken.* Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
2. Reactievat **zonder luchtbellenvorming** maximaal vullen met **monsteroplossing pH 7,8** (ca. 7 – 8 mL) uit arbeidsstap 3.
3. O_2-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het luchtdicht en zonder luchtbellenvorming afsluit (overtollig medium loopt over). Deze bereiding ca. **1 – 2 min roeren** op de magneetroerder tot het meetapparaat een constante zuurstofwaarde aanduidt.
Absoluut op luchtbellenvrijheid van de gehele testaanmenging letten!
4. Ondertussen het gehele oppervlak van de elektrode-adapter en vooral de beide steekboringen voor een luchtdichte afdichting met gedestilleerd water (bijv. met behulp van een spuitfles) bevochtigen.
5. Gereactiveerd reagens *A-Tox* R2 uit de koelkast en reagens *N-Tox* R2 uit het vriesvak nemen. De reagentia door kort schudden eerst homogeniseren. Vervolgens **100 µL reagens *A-Tox* R2** en **100 µL reagens *N-Tox* R2** toevoegen door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit. Vervolgens beide reagentia opnieuw koel (A-Tox R2 > 6 °C) resp. ijskoud (N-Tox R2) bewaren.
6. **Na 2 min** (en voor de toevoeging de reagentia R3 en R3!) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing O_{NR-M0} (O_2-concentratie in de nitrificatie-remmingsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 0 min).
Belangrijk: Tijdens de 2 min en alvorens de reagentia A-Tox R3 en N-Tox R3 gepipetteerd wordt, de micrometerspuit goed spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!
7. Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *A-Tox* R3***** en **100 µL reagens *N-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit.
8. **Na 10 min aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing O_{NR-M10} (O_2-concentratie in de nitrificatieremmingsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 10 min).

Arbeidsstap 6: Analyse

(1) Zuurstofverbruik in de controlebereiding: $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$

(2) Zuurstof-eigenvertering van het monster: $\Delta O_{ZE-} = O_{ZE-M0} - O_{ZE-M10}$

(3) Zuurstofverbruik in nitrificatieremmingsaanmenging van het monster: $\Delta O_{NR-M} = O_{NR-M0} - O_{NR-M10}$

* $\Delta O_{ZE-M} = 0$, wanneer geen O_2-eigenvertering van het monster voorhanden.

Gecorrigeerd zuurstofverbruik in de monsteraanmenging met inachtneming van de zuurstof-eigenvertering::
$\Delta O_M = \Delta O_{NR-M} - \Delta O_{ZE-M}$

Resultaat: % remming van de totale nitrificatie = [(ΔO_C - ΔO_M) : ΔO_M] x 100

Voor de analyse raden wij aan het bijgevoegde analyseformulier op de achterzijde van deze gebruiksaanwijzing te gebruiken. Dit formulier mag voor eigen gebruik gekopieerd worden

* Exacte aanwijzingen voor het opsteken van de elektrodeadapter op de zuurstofelektrode vindt u in de bijgevoegde gebruiksaanwijzing van de "Starterset voor BioFix® Nitrificatieremtests" (REF 970101).
** Alternatief kan ook reagens *N-Tox* R1 worden ingezet.
*** Alternatief kan ook reagens *N-Tox* R4 worden ingezet.
**** Belangrijk! Na toevoeging van *A-Tox* R2 en vóór toevoeging van *N-Tox* R2 de micrometerspuit goed spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!
***** Belangrijk! Na toevoeging van *A-Tox* R3 en vóór toevoeging van *N-Tox* R3 de micrometerspuit meerdere keren goed spoelen met gedestilleerd water!

Interpretatie van de meetresultaten:
De verkregen remwaarden kunnen zoals volgt worden geënterpreteerd:

0 – 10 % remming	Monster niet nitrifikatieremmend
10 – 20 % remming	Monster potentieel nitrificatieremmend
20 – 80 % remming	Monster nitrificatieremmend
> 80 % remming	Monster verdunnen en nog eenmaal testen

Als verdere, normonafhankelijke mogelijkheid ter vergelijking en voor de beoordeling van vastgestelde remgegevens aan verschillende monsternemingen of tussen verschillende standplaatsen kan het resultaat, in aansluiting aan de resultaatopgave van andere biotoxiciteitstesten (bijv. lichtgevende bacterietest naar DIN EN ISO 11348), ook als G_{NR}**-waarde** worden aangegeven. Deze is gedefinieerd als reciproke waarde van de eerste verdunningstrap van het monster, waarbij de remming van de nitrificatie voor de eerste maal kleiner als 20 % is.
Voorbeeld: Wordt bij een 1 + 1 verdunning van een monster een remming van 35 % vastgesteld en bij een 1 + 3 verdunning een remming van 15 %, dan zou in dit geval de G_{NR}-waarde = 4 zijn.

.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Duitsland
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Analyseformulier Speciale Applicatie Screeningtest *A/N-Tox*

nl

Analysedatum: _____ **Naam van de uitvoerder:** _____

Controle (Arbeidsstap 2)			Monstermeting							Resultaat
			Monster-omschrijving	Eigenvertering (Arbeidsstap 4)			Nitrificatieremming (Arbeidsstap 5)			Gecorrigeerd O_2-verbruik	
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{ZE-M0} [mg/L]	O_{ZE-M10} [mg/L]	ΔO_{ZE-M} [mg/L] = $O_{ZE-M0} - O_{ZE-M10}$	O_{NR-M0} [mg/L]	O_{NR-M10} [mg/L]	ΔO_{NR-M} [mg/L] = $O_{NR-M0} - O_{NR-M10}$	ΔO_M [mg/L] = $\Delta O_{NH-M} - \Delta O_{ZE-M}$	Remming [%] = [(ΔO_C - ΔO_M) : ΔO_C] x 100

O_{C0}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de controlebereiding op het tijdstip t_0 bij het begin van de test

O_{C10}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de controlebereiding na t = 10 min incubatie

ΔO_C: Zuurstofverbruik [mg/L] in de controlebereiding na t = 10 min incubatie

O_{ZE-M0}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de eigenverteringsaanmenging van het monster op het tijdstip t_0 bij het begin van de test

O_{ZE-M10}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de eigenverteringsaanmenging van het monster na t = 10 min incubatie

ΔO_{ZE-M}: Zuurstofverbruik [mg/L] in de eigenverteringsaanmenging van het monster na t = 10 min incubatie

O_{NR-M0}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de nitrificatieremmingssaanmenging van het monster op het tijdstip t_0 bij het begin van de test

O_{NR-M10}: Zuurstofconcentratie [mg/L] in de nitrificatieremmingssaanmenging van het monster na t = 10 min incubatie

ΔO_{NR-M}: Zuurstofverbruik [mg/L] in de nitrificatieremmingssaanmenging van het monster na t = 10 min incubatie

APPLICAZIONE SPECIALE 12.24 it

REF 970001 / 970002

Screeningtest BioFix® *A/N-Tox*

Metodo:
Metodo amperometrico di determinazione del potere d'inibizione generale dei componenti delle prove sulla nitrificazione microbica con impiego simultaneo di ceppi batterici ad azione ossidante sull'ammoniaca e di ceppi batterici ad azione ossidante sul nitrito. Il test non consente una valutazione differenziata, adatta a determinare se viene inibito in particolare lo stadio di ossidazione dell'ammoniaca o in particolare quello del nitrito. I risultati sono espressi in % d'inibizione del consumo di ossigeno nella soluzione di prova a confronto con una soluzione di controllo non inibita. Per l'esecuzione del test sono necessari i corredi di reagenti "BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione *A-Tox*" (REF 970001) e "BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione *N-Tox*" (REF 970002).

Campo di misura:	**0 – 100 % d'inibizione**
Tempo di reazione:	**10 min**
Temperatura die reazione:	**temperatura ambiente**

Procedimento:
Accessori necessari: BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione *A-Tox* (REF 970001), BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione *N-Tox* (REF 970002), Starter-Set per i BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione (REF 970101), CHROMAFIL® Filtro monouso, non sterile, dimensioni dei pori 0,45 µm (REF 91652), misuratore di ossigeno, agitatore magnetico, stativo con pinze, pipetta a stantuffo con punte.

Prima di eseguire il test si prega di leggere e rispettare scrupolosamente i fogli illustrativi dei corredi BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione A-Tox e N-Tox!

Nell'ambito di una serie di misurazioni, si raccomanda di ripetere una nuova rilevazione di controllo ogni due rilevazioni della prova al massimo (determinazione del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa ovvero della sua capacità di inibizione del processo di nitrificazione)

In base al principio sottostante a questo test rapido di rilevazione dell'ossigeno, i **prova contenenti sostanze a forte consumo di ossigeno** potrebbero produrre dei falsi risultati di rilevazione e mascherare eventuali effetti con potenziale di inibizione del processo di nitrificazione. Per compensare il forte consumo di ossigeno, oltre a una rilevazione di controllo (2ª fase) e alla misurazione del grado di inibizione del processo di nitrificazione della prova, ovvero la diluizione della prova (5ª fase), è necessario determinare il consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (la diluizione della prova) (4ª fase). Questo dato viene incluso nel calcolo del risultato finale.

Sequenza di rilevazioni raccomandate con stima del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:
C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → …

Sequenza di rilevazioni raccomandate senza stima del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:
C → IN-P → IN-P → C → IN-P → IN-P → C → IN-P → IN-P → C → …

C = rilevazione di controllo (2ª fase)
CO-P = consumo di ossigeno inerente alla prova stessa o diluizione della prova (4ª fase)
IN-P = inibizione del processo di nitrificazione della prova o diluizione della prova (5ª fase)

1ª fase: Preparazione dei batteri nitrificanti (Reagenti *A-Tox* R2 y *N-Tox* R2)

Preparare i reagenti *A-Tox* R2 e *N-Tox* R2 come descritto nei fogli illustrativi dei rispettivi corredi di test. Osservare le disposizioni locali!

2ª fase: Controllo

1. Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O2.* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
2. **Agitare energicamente per 30 s il reagente *A-Tox* R1**** per ossigenarlo e riempire quindi il recipiente di reazione con il **reagente *A-Tox* R1**** (circa 7 – 8 mL) fino a farlo traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
3. L'elettrodo O_2 completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a chiuderlo ermeticamente e senza bolle (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1 – 2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione.
   Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!
4. Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.
5. Estrarre dal refrigeratore i reagenti *A-Tox* R2 e *N-Tox* R2 già riattivati ed omogeneizzarli agitandoli brevemente. Dopodiché **aggiungere 100 µL di reagente *A-Tox* R2** e **100 µL di reagente *N-Tox* R2** (Importante! Dopo l'aggiunta di *A-Tox* R2 e prima dell'aggiunta di *N-Tox* R2, lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!) attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi, utilizzando a tale scopo una siringa micrometrica. Reinserire subito i reagenti in un luogo fresco (*A-Tox* R2 > 6 °C) o nel surgelatore (*N-Tox* R2).
6. **Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti *A-Tox* R3 e *N-Tox* R3!) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di controllo **OC0** (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 0 min).
   Importante: durante questi 2 min, e prima di pipettare i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3, lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!
7. Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente *A-Tox* R3** e **100 µL di reagente *N-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
8. **Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di controllo $\mathbf{O_{C10}}$ (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 10 min).

3ª fase: Preparazione della prova

1. In caso di prove particolarmente torbide si deve dapprima eseguire una prefiltrazione non sterilizzata con filtri (a pieghe) comunemente reperibili in commercio oppure mediante centrifugazione o metodi simili.
2. Regolare il valore di pH della prova sul **pH 7,8 ± 0,2** aggiungendo 0,1 N NaOH oppure 0,1 N HCl.
3. **Filtrare finemente 20 mL di prova** con CHROMAFIL® Filtri monouso, non sterili, dimensioni dei pori 0,45 µm (REF 91652) (per eliminare la maggior parte della microflora già presente naturalmente, che può produrre dei falsi risultati).
4. Versare in una provetta appropriata (p.es., becher di capacità sufficiente)
   16 mL di soluzione di prova filtrata finemente e
   4 mL di reagente *A-Tox* R4.***
5. Mescolare bene il preparato e agitare in modo energico per 30 s per aumentare la percentuale di ossigeno.
   Infine, utilizzare come **soluzione di prova** per determinare il consumo di ossigeno inerente alla prova (4ª fase) ovvero il grado di inibizione del processo di nitrificazione (5ª fase).

4ª fase: Consumo di ossigeno inerente alla prova

***Nota:** Nel caso di campioni che **non** consumano ossigeno è possibile saltare la 4a fase. Nell'ambito della valutazione del test e del calcolo della capacità di inibizione del processo di nitrificazione, in questo caso viene considerata la variabile $\Delta O_{CO-P} = 0$!*

1. Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O2.* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
2. Riempire il recipiente di reazione con la **soluzione di prova, pH 7,8** (circa 7 – 8 mL) secondo la 3ª fase fino a farla traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
3. L'elettrodo O_2 completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a chiuderlo ermeticamente e senza bolle (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1 – 2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione.
   Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!
4. Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.

Importante: Non aggiungere i reagenti *A-Tox* R2 e *N-Tox* R2!

5. **Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti *A-Tox* R3 e *N-Tox* R3!) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova $\mathbf{O_{CO-P0}}$ (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min).
6. Dopodiché aggiungere **immediatamente** **100 µL di reagente *A-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi, utilizzando a tale scopo una siringa micrometrica, quindi lavare accuratamente la siringa caricandola più volte con acqua distillata e aggiungere 100 µL di *N-Tox* R3.
7. **Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di prova $\mathbf{O_{CO-P10}}$ (concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 10 min).

5ª fase: Inibizione del processo di nitrificazione della prova

1. Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O2.* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
2. Riempire il recipiente di reazione con la **soluzione di prova**, pH 7,8 (circa 7 – 8 mL) secondo la 3a fase fino a farla traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
3. L'elettrodo O2 completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a chiuderlo ermeticamente e senza bolle (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1 – 2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione. **Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!**
4. Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.
5. Estrarre dal refrigeratore o dal congelatore i reagenti *A-Tox* R2 e *N-Tox* R2 già riattivati e omogeneizzarli agitandoli brevemente. Dopodiché **aggiungere 100 µL di reagente *A-Tox* R2** e **100 µL di reagente *N-Tox* R2** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi, utilizzando a tale scopo una siringa micrometrica. Reinserire subito i reagenti in un luogo fresco (*A-Tox* R2 > 6 °C) o nel surgela tore (*N-Tox* R2).
6. **Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti *A-Tox* R3 e *N-Tox* R3!) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova $\mathbf{O_{IN-P0}}$ (concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min).
   Importante: Durante questi 2 min e prima di pipettare i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3 si deve lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!
7. Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente *A-Tox* R3***** e **100 µL di reagente *N-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
8. **Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il t**enore d'ossigeno** della soluzione di prova $\mathbf{O_{IN-P10}}$ (Concentrazione di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova nel momento t = 10 min).

6ª fase: Valutazione

(1) Consumo di ossigeno nella soluzione di controllo: $\mathbf{\Delta O_C} = O_{C0} - O_{C10}$

(2) Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa: $\mathbf{\Delta O_{CO-P}}^* = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$

(3) Consumo di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova: $\mathbf{\Delta O_{IN-P}} = O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$

* $\Delta O_{CO-P} = 0$, in caso di assenza del consumo di O2 inerente alla prova.

Consumo di ossigeno rettificato nella quota di prova considerando il consumo di ossigeno inerente alla prova:
$\mathbf{\Delta O_P} = \Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$

Risultato: % di inibizione della nitrificazione = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

Si suggerisce l'uso del formulario di valutazione sul retro delle presenti istruzioni. L'utilizzatore può riprodurre a piacere il modulo per il suo uso personale.

* Per dettagliate istruzioni relative al montaggio dell'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo dell'ossigeno si prega di consultare il foglio illustrativo del „Starter-Set per i BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione " (REF 970101).
** In alternativa può essere impiegato anche il reagente *N-Tox* R1.
*** In alternativa può essere impiegato anche il reagente *N-Tox* R4.
**** Importante! Dopo l'aggiunta di *A-Tox* R2 e prima dell'aggiunta di *N-Tox* R2, lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!
***** Importante! Dopo l'aggiunta di *A-Tox* R3 e prima dell'aggiunta di *N-Tox* R3, lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!

Interpretazione dei risultati:
I valori ottenuti possono essere così interpretati:

0 – 10 % inibizione	La prova non inibisce il processo di nitrificazione
10 – 20 % inibizione	La prova può potenzialmente inibire il processo di nitrificazione
20 – 80 % inibizione	La prova inibisce il processo di nitrificazione
> 80 % inibizione	Diluire la prova e ripetere il test

Come ulteriore possibilità, non soggetta all'applicazione di particolari norme, per confrontare e valutare i dati sull'inibizione in vari tempi della prova o tra diversi punti, il risultato può anche essere indicato come valore GIN, in linea con altri test di biotossicità (p.es., test dei batteri luminosi conformemente alla norma DIN EN ISO 11348). Questo valore è considerato il reciproco della prima fase di diluizione della prova dove, per la prima volta, l'inibizione del processo di nitrificazione è inferiore al 20 %.
Esempio: Se per una diluizione 1 + 1 della prova si registra un'inibizione del 35 % e per un rapporto di 1 + 3 la percentuale di inibizione è del 15 %, il valore GIN = 4.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Germania
Tel.: +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***

PD 36815 / A012763 / 970001/002 / 1240.3

Modulo di valutazione per Applicazione Speciale Screeningtest *A/N-Tox* it

Data dell'analisi: _____ **Nome dell'utilizzatore:** _____

Controllo (2ª fase)			Medida de prueba							Risultato
			Denominazione della prova	Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (4ª fase)			Inibizione della nitrificazione (5ª fase)			
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{CO-P0} [mg/L]	O_{CO-P10} [mg/L]	ΔO_{CO-P} [mg/L] = $O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$	O_{IN-P0} [mg/L]	O_{IN-P10} [mg/L]	ΔO_{IN-P} [mg/L] = $O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$	Consumo di O_2 rettificato ΔO_P [mg/L] = $\Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$	Inibizione [%] = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

O_{C0}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo al momento t0 all'inizio del test

O_{C10}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo dopo t = 10 min di incubazione

ΔO_C: Consumo di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo dopo t = 10 min di incubazione

O_{CO-P0}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa al momento t_0 all'inizio del test

O_{CO-P10}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa dopo t = 10 min di incubazione

ΔO_{CO-P}: Consumo di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa dopo t = 10 min di incubazione

O_{IN-P0}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova al momento t0 all'inizio del test

O_{IN-P10}: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova dopo t = 10 min di incubazione

ΔO_{IN-P}: Consumo di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova dopo t = 10 min di incubazione