

BioFix® Nitrifikationshemmtest *N-Tox*

Methode:

Amperometrische Methode zur Bestimmung der spezifischen Hemmwirkung von Probeninhaltsstoffen auf die Nitritoxidation im Rahmen der mikrobiellen Nitrifikation mit Hilfe definierter Bakterienstämme, vorzugsweise der Gattung *Nitrobacter*. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt als % Hemmung des Sauerstoffverbrauches in der Probelösung im Vergleich zu einer ungehemmten Kontrolle.

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

Inhalt Reagenziensatz:

5 Reaktionsgefäße	1 Flasche, weiß mit 5 mL <i>N-Tox</i> R3
1 Flasche, naturfarben mit 100 mL <i>N-Tox</i> R1	1 Flasche, schwarz mit 100 mL <i>N-Tox</i> R4
1 Rundkuvette mit 2 mL <i>N-Tox</i> R2	

Gefahrenhinweise:

Dieser Schnelltest enthält keine kennzeichnungspflichtigen Gefahrstoffe. Die verwendeten nitrifizierenden Mikroorganismen gehören nach Merkblatt B006 1/92 ZH 1/346 der Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie zur Risikogruppe 1, d. h., es besteht nach dem Stand der Wissenschaft kein Risiko für den Menschen und für Wildtiere.

Lagerung:

Entweder den gesamten Testkit BioFix® Nitrifikationshemmtest *N-Tox*, in jedem Falle jedoch **Reagenz *N-Tox* R2 bei -20 ± 2 °C eiskalt lagern**. Die Box mit den restlichen Reagenzien kann auch kühl bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Das aufgedruckte Verfalldatum beachten. **Reagenz R2 erst unmittelbar vor Gebrauch dem Eisfach entnehmen, auftauen und homogenisieren.** Auch bei Durchführung mehrerer Tests immer im Eisfach zwischenlagern.

Bitte vor einer Testdurchführung die nachfolgenden Hinweise aufmerksam lesen und unbedingt beachten!

- Folgendes weiteres Zubehör wird zu einer ordnungsgemäßen Testdurchführung benötigt: Starter-Set für BioFix® Nitrifikationshemmteste (REF 970101), CHROMAFIL® Einmalfilter unsteril, Porengröße 0,45 µm (REF 91652), Sauerstoffmessgerät, Magnetrührer, Stativ mit Klemmen, Kolbenhüppipetten mit Spitzen.
- Der **Sauerstoffgehalt der Probe** bzw. der Probenverdünnung sollte für eine optimale Testdurchführung **> 8,0 mg/L O₂** betragen. Gegebenenfalls durch kurzes Belüften oder kräftiges Schütteln die Probe(-verdünnung) vorab mit Sauerstoff anreichern.
- Die **Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers** hat einen signifikanten Einfluss auf das Maß der Sauerstoffzehrung! Deshalb alle Messungen einer Testreihe mit konstant eingestellter Rührgeschwindigkeit durchführen. Optimale Rührgeschwindigkeit: 200 bis 400 rpm.
- Die Reagenzien **R1, R3 und R4** vor der Durchführung der Tests auf **Raumtemperatur** bringen! Dies geschieht am besten dadurch, dass man diese Reagenzien bereits am Tag vor der Analyse dem Kühlschrank entnimmt.
- Die Reagenzien R1 und R4 vor Gebrauch kurz schütteln.
- Reagenz R2 erst unmittelbar vor Gebrauch dem Eisfach entnehmen, vollständig auftauen und anschließend sofort wieder eiskalt lagern.** Auch bei Durchführung mehrerer Tests immer im Eisfach zwischenlagern.
- Das Aufziehen der Reagenzien **R2 und R3** mit Hilfe der Mikroliterspritze muss **luftblasenfrei** erfolgen!
- Unbedingt die Mikroliterspritze nach jedem Pipettiervorgang durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser spülen!**
- Den Elektroden-Adapter, das Reaktionsgefäß und die Sauerstoffelektrode nach **jedem** Messvorgang mit destilliertem Wasser spülen, um Fremdkontaminationen bei Messung der nächsten Probe zu vermeiden.
- Die im Testkit enthaltenen Reaktionsgefäße sind Mehrweggefäße und können nach Spülen mit destilliertem Wasser erneut benutzt werden.

Ausführung:

Es wird empfohlen, innerhalb einer Messreihe nach **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 *N-Tox* R2)

Das *Reagenz N-Tox R2* wird erst **unmittelbar vor** Testbeginn dem Eisfach entnommen, **vollständig** (!) aufgetaut und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisiert. **Direkt nach der Zugabe** zum jeweiligen Testansatz das *Reagenz N-Tox R2* wieder ins Eisfach zurückstellen!

Hinweis: Auch bei korrekter Lagerung verlieren die Bakterien in Reagenz N-Tox R2 mit zunehmendem Alter natürlicherweise an Aktivität. Dies hat jedoch keinen Einfluss auf das Messergebnis des Testes in % Hemmung, da die Verhältnismäßigkeit zwischen möglicher Hemmung des Probenansatzes im Vergleich zum Sauerstoffverbrauch im Kontrollansatz auch bei abnehmender Aktivität der Bakterien immer gewahrt bleibt.

Arbeitsschritt 2: Kontrollansatz

- Elektroden-Adapter auf O₂-Elektrode aufstecken*. Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
- Reagenz *N-Tox* R1** zur Sauerstoffanreicherung für **30 s kräftig schütteln** und anschließend das Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Reagenz *N-Tox* R1** füllen (ca. 7–8 mL).
- O₂-Elektrode mit aufgestecktem 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!
- 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.
- Reagenz *N-Tox* R2 dem Eisfach entnehmen, vollständig auftauen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe von 100 µL Reagenz *N-Tox* R2** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. *Reagenz N-Tox R2* sofort wieder in Eisfach zurückstellen.
- Nach 2 Minuten** (und *vor* Zugabe von Reagenz *N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K0} (O₂-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 0 min).
Wichtig: Während der 2 Minuten und bevor Reagenz N-Tox R3 pipettiert wird, die Mikroliterspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!
- Anschließend **sofort Zugabe von 100 µL Reagenz *N-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
- Nach 10 Minuten Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K10} (O₂-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 10 min)

* Exakte Hinweise zum Aufstecken des Elektroden-Adapters auf die Sauerstoffelektrode entnehmen Sie bitte dem Beipackzettel des „Starter-Set für BioFix® Nitrifikationshemmteste“ (REF 970101).

Arbeitsschritt 3: Probenvorbereitung

- Bei stark getrübbten Proben zunächst eine unsterile Vorfiltration mit Hilfe handelsüblicher (Falten-)Filter, durch Zentrifugation oder vergleichbare Methoden durchführen.
- Den pH-Wert der Probe mit Hilfe von 0,1 N NaOH bzw. 0,1 N HCl auf **pH 7,8 ± 0,2** einstellen.
- 20 mL Probe** mit Hilfe von CHROMAFIL® Einmalfiltern, unsteril, Porengröße 0,45 µm (REF 91652) **feinfiltrieren** (zur Entfernung des größten Teils der natürlicherweise bereits vorhandenen Mikroflora, die das Messergebnis verfälschen kann).
- Man gibt in ein geeignetes Gefäß (z. B. Becherglas ausreichender Größe) **16 mL feinfiltrierte Probelösung** und **4 mL Reagenz *N-Tox* R4**.
- 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 $\Delta O_{EZ-P} = 0$ gesetzt!

- Elektroden-Adapter auf O₂-Elektrode aufstecken*. Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
- Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7–8 mL).
- O₂-Elektrode mit aufgestecktem 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!
- 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 wird kein Reagenz *N-Tox* R2 zugegeben!
- Nach 2 Minuten** (und *vor* Zugabe von Reagenz *N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{EZ-P0} (O₂-Konzentration des Eigenzehrungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 0 min).
- Anschließend **sofort Zugabe von 100 µL Reagenz *N-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
- Nach 10 Minuten Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{EZ-P10} (O₂-Konzentration des Eigenzehrungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 10 min).

Arbeitsschritt 5: Nitrifikationshemmung der Probe

- Elektroden-Adapter auf O₂-Elektrode aufstecken*, Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
- Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7–8 mL).
- O₂-Elektrode mit aufgestecktem 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!
- 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.
- Reagenz *N-Tox* R2 dem Eisfach entnehmen, vollständig auftauen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe von 100 µL Reagenz *N-Tox* R2** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. *Reagenz N-Tox R2* sofort wieder in Eisfach zurückstellen.
- Nach 2 Minuten** (und *vor* Zugabe von Reagenz *N-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{NH-P0} (O₂-Konzentration des Nitrifikationshemmungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 0 min).
- Anschließend **sofort Zugabe von 100 µL Reagenz *N-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
- Nach 10 Minuten Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{NH-P10} (O₂-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:

$$\Delta O_{EZ-P} = O_{EZ-P0} - O_{EZ-P10}$$

(3) Sauerstoffverbrauch im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe:

$$\Delta O_{NH-P} = O_{NH-P0} - O_{NH-P10}$$

#: $\Delta O_{EZ-P} = 0$, falls keine O₂-Eigenzehrung der Probe vorhanden

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

Endergebnis:

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

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).

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 Probenahmetermen und 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 1:2 Verdünnung einer Probe eine 35 %ige Hemmung ermittelt und bei einer 1:4 Verdünnung eine 15 %ige Hemmung, dann wäre in diesem Falle der G_{NH}-Wert = 4.

Entsorgung:

Die Styroporbox mit den leeren Vierkantflaschen und Rundkuvetten kann problemlos über den normalen Hausmüll entsorgt werden. Die Testansätze können problemlos über den Ausguss entsorgt werden. Einschränkungen können entstehen, wenn die Probe gesundheitsgefährdende oder giftige, speziell entsorgungspflichtige Substanzen enthält. Für die ordnungsgemäße Entsorgung solcher Testansätze ist der Anwender gemäß den dafür gültigen Richtlinien und Bestimmungen selbst verantwortlich.

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-P0} [mg/L]	O _{EZ-P10} [mg/L]	ΔO _{EZ-P} [mg/L] = O _{EZ-P0} - O _{EZ-P10}	O _{NH-P0} [mg/L]	O _{NH-P10} [mg/L]	ΔO _{NH-P} [mg/L] = O _{NH-P0} - O _{NH-P10}	ΔO _P [mg/L] = ΔO _{NH-P} - ΔO _{EZ-P}	Hemmung [%] = [(ΔO _K - ΔO _P) : ΔO _K] × 100

O_{K0}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Kontrollansatz zum Zeitpunkt t₀ 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-P0}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe zum Zeitpunkt t₀ zu Versuchsbeginn
 O_{EZ-P10}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation
 ΔO_{EZ-P}: Sauerstoffverbrauch [mg/L] im Eigenzehrungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation
 O_{NH-P0}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe zum Zeitpunkt t₀ zu Versuchsbeginn
 O_{NH-P10}: Sauerstoffkonzentration [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation
 ΔO_{NH-P}: Sauerstoffverbrauch [mg/L] im Nitrifikationshemmungsansatz der Probe nach t = 10 min Inkubation

BioFix® Nitrification Inhibition Test *N-Tox*

Method:

Amperometric method of determining the specific retardation effect of the substances contained in a sample on nitrite oxidation in connection with microbial nitrification with the aid of defined bacterial strains, preferably of the genus *Nitrobacter*. The results are specified as % retardation of oxygen consumption in the sample solution in comparison to a non-inhibited control solution.

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

Contents of reagent set:

5 reaction vessels	1 bottle, white, containing 5 mL <i>N-Tox</i> R3
1 bottle, natural colour, containing 100 mL <i>N-Tox</i> R1	1 bottle, black, containing 100 mL <i>N-Tox</i> R4
1 test tube containing 2 mL <i>N-Tox</i> R2	

Safety precautions:

This rapid test does not involve any hazardous substances subject to compulsory marking requirements. According to information sheet B006 1/92 ZH 1/346 issued by the employers' liability insurance association for the chemical industry (Germany), the employed nitrifying microorganisms belong to risk group I, i. e. no risk applies to humans or vertebrates.

Storage:

Reagent *N-Tox* R2 must be stored ice-cold at -20 ± 2 °C. The remainder of BioFix® Nitrification Inhibition Test *N-Tox* can also be stored ice-cold together with reagent *N-Tox* R2 or in a cool state at +2 °C to +8 °C. Note the printed use-by date. Reagent R2 should only be removed from the ice compartment, defrosted and homogenized directly prior to use. When carrying out several tests, always return to the ice compartment for interim storage.

Please read the information below carefully before carrying out a test and be sure to observe the instructions!

- In order to carry out testing in the correct manner, the following materials and equipment are required: Starter Set for BioFix® Nitrification Inhibition Tests (REF 970101), CHROMAFIL® membrane filter, single-use, unsterile, pore size 45 µm (REF 91652), oxygen measuring device, magnetic stirrer, stand with clamps, piston pipettes with tips.
- For optimum testing, the **oxygen content of the sample** or the sample dilution should be **> 8.0 mg/L O₂**. If necessary, enrich with oxygen before testing by briefly aerating or vigorously shaking the sample (dilution).
- The **mixing speed of the magnetic stirrer** significantly influences the amount of oxygen consumption! Therefore, carry out all measurements of a test series with a constant mixing speed. Optimal speed: 200 to 400 rpm
- Adjust temperature of reagents **R1, R3 and R4 to room temperature**, prior to carrying out the tests! This is best achieved by removing these reagents from the refrigerator on the day before analysis.
- Shake reagents R1 and R4 briefly before use!
- First remove reagent R2 from the freezer immediately before use, fully defrost and finally immediately store below freezing again.** Also store below freezing in between multiple tests.
- Reagents **R2 and R3** are to be drawn up using the microliter syringe **without air bubbles!**
- It is essential that the microliter syringe be rinsed after each pipetting operation by drawing up distilled water several times!**
- Rinse the electrode adapter, the reaction vessel and the oxygen electrode after **each** measuring operation, in order to avoid contamination with foreign matter when measuring the next sample.
- The reaction vessels contained in the test kit can be reused after rinsing with distilled water.

Procedure:

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 →
 C = Control measurement (step 2)

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 nitrite-oxidizing bacteria (Reagent *N-Tox* R2)

First take the reagent *N-Tox* R2 from the freezer immediately before the test, **fully (!)** defrost and homogenize by shaking briefly. Immediately after adding to the control and sample preparations, replace the reagent *N-Tox* R2 in the freezer!

*Note: The bacteria in reagent *N-Tox* R2 also naturally lose activity with increased age even if stored correctly. This does not influence the measurement result of the test in % inhibition, however, since the relationship between possible inhibition of the sample preparation in comparison to the oxygen consumption in the control always remains constant even with increased bacteria activity.*

Step 2: Control

- Fit electrode adapter to O₂ electrode*. Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
- Shake reagent *N-Tox* R1 vigorously for 30 s** to enrich the oxygen content, then fill the reaction vessel with **reagent *N-Tox* R1** until it overflows, **avoiding air bubbles** (approx. 7–8 mL).
- Carefully insert O₂ 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!**
- 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.
- Remove prepared reagent *N-Tox* R2 (see Step 1) from the ice compartment, **fully** defrost and homogenize by shaking briefly. Then **add 100 µL of reagent *N-Tox* R2** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe. Return reagent *N-Tox* R2 to the ice compartment immediately.
- After 2 minutes** (and before adding reagent *N-Tox* R3 !), **read** and record the **oxygen concentration** in the control **O_{CO}** (O₂ concentration of control at time t = 0 min).
*Important: Rinse microliter syringe thoroughly by drawing up distilled water several times in the course of the 2 minutes and before reagent *N-Tox* R3 is pipetted!*
- Now add **100 µL of reagent *N-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe.
- After 10 minutes, read** and record the **oxygen concentration** in the control **O_{C10}** (O₂ concentration of control at time t = 10 min).

* 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).

Step 3: Sample Preparation

- In case of substantially turbid samples, first carry out non-sterilizing preliminary filtration using standard (folded) filters, by centrifuging or comparable methods.
- Set the pH value of the sample to **pH 7.8 ± 0.2**, using 0.1 N NaOH or 0.1 N HCl.
- 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.
- Place **16 mL finely filtered sample solution** and **4 mL reagent *N-Tox* R4** in a suitable container (e. g. suitably sized beaker).
- 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 $\Delta O_{SC-S} = 0!$*

- Fit electrode adapter to O₂ electrode*. Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
- 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).
- Carefully insert O₂ 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!**
- 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: No reagent *N-Tox* R2 is added!
- After 2 minutes** (and before adding reagent *N-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation **O_{SC-S0}** (O₂ concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 0 min).
- Now **add 100 µL of reagent *N-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe.
- After 10 minutes, read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation **O_{SC-S10}** (O₂ concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 10 min).

Step 5: Nitrification inhibition of the sample

- Fit electrode adapter to O₂ electrode*. Provide reaction vessel with stirring bar and place on magnetic stirrer.
- 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).
- Carefully insert O₂ 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!**
- 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.
- Remove reagent *N-Tox* R2 from the ice compartment, **fully** defrost and homogenize by shaking briefly. Then **add 100 µL of reagent *N-Tox* R2** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe. Return reagent *N-Tox* R2 to the ice compartment immediately.
- After 2 minutes** (and before adding reagent *N-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation **O_{NI-S0}** (O₂ concentration of sample preparation for determination of nitrification inhibition at time t = 0 min).
- Now **add 100 µL of reagent *N-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microliter syringe.
- After 10 minutes, read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation **O_{NI-S10}** (O₂ concentration of sample preparation for determination of nitrification inhibition at time t = 10 min).

Step 6: Evaluation

- Oxygen consumption in the control: $\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$
 - Oxygen self-consumption of the sample: $\Delta O_{SC-S} = O_{SC-S0} - O_{SC-S10}$
 - Oxygen consumption in sample preparation for determination of nitrification inhibition: $\Delta O_{NI-S} = O_{NI-S0} - O_{NI-S10}$
- #: $\Delta O_C \cdot C = 0$, if there is no oxygen self-consumption of the sample

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

Final result:

% inhibition of nitrite oxidation = $[(\Delta O_C - \Delta O_S) : \Delta O_C] \times 100$

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).

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 a nitrification inhibition of less than 20 %.

Example: If 35 % inhibition is obtained at a 1:2 dilution of a sample and a 15 % inhibition at a 1:4 dilution, in this case the G_{NI}-Value would be G_{NI} = 4.

Disposal:

The polystyrene box with the empty square bottles and test tubes can be disposed of with normal domestic refuse without any problems. The test preparations can be drained away by pouring into a sink. Restrictions may arise if the sample contains harmful or toxic substances which are subject to special disposal requirements. The user is responsible for disposing of such test preparations in accordance with the applicable rules and regulations.

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] = ΔO _{NI-S} - ΔO _{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 t₀
 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 t₀
 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 t₀
 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

BioFix® Test d’Inhibition de Nitrification *N-Tox*

Méthode :

Méthode ampérométrique pour la détermination de l’action inhibitrice particulière des substances d’échantillonnage quant l’oxydation au nitrite dans le cadre de la nitrification microbienne à l’ide de groupes de bactéries définis, de préférence appartenant à la catégorie *Nitrobacter*. L’indication des résultats a lieu sous forme de % d’inhibition de la consommation d’oxygène dans la solution d’échantillonnage par comparaison avec un contrôle exempt d’inhibition.

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

Contenu du jeu de réactifs :

5 récipients pour réactifs

1 flacon, blanc avec 5 mL de *N-Tox* R3

1 flacon, couleur naturelle avec 100 mL de *N-Tox* R1

1 cuvette avec 2 mL de *N-Tox* R2

1 flacon, noir avec 100 mL de *N-Tox* R4

Indication de danger :

Ce test rapide ne contient aucune substance dangereuse nécessitant une caractérisation. Les microorganismes nitrifiants utilisés appartiennent au groupe de risque 1 conformément à la fiche technique B006 1/92 ZH 1/346 de la fédération professionnelle de l’industrie de la chimie (Allemagne) ; cela signifie qu’il n’y a **aucun** risque pour l’homme et les animaux vertébrés d’après la niveau actuel de la technique

Stockage :

Le BioFix® Test d’inhibition de Nitrification *N-Tox* doit être conservé dans un **réfrigérateur à des températures de -20 ± 2 °C**. La date de limite de conservation imprimé doit être respectée. Entreposer toujours le réactif *N-Tox* R2 sous forme intermédiaire dans un réfrigérateur lors de l’accomplissement de plusieurs tests.

Veillez lire et suivre impérativement les indications suivantes avant d’accomplir un test !

- Les accessoires suivants sont nécessaires à un accomplissement du test dans les règles : 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) appareil de mesure d’oxygène, mélangeur magnétique, support avec pinces, pipettes à course de piston avec pointes.
- La **teneur en oxygène de l’échantillon** ou de la dilution d’échantillonnage devrait s’élever à **> 8,0 mg/L O₂** pour un accomplissement optimal du test. Le cas échéant, enrichir en oxygène par une brève aération ou en agitant vigoureusement la dilution d’échantillonnage / e prélèvement.
- La **vitesse de mélange de l’agitateur magnétique** a une influence révélatrice sur la mesure de la demande en oxygène ! C’est pour cette raison qu’il est nécessaire d’effectuer toutes les mesures d’une série de tests avec un réglage de vitesse demélange constant. Vitesse de mélange optimale : de 200 à 400 rpm.
- Les réactifs **R1, R3 et R4** avant l’accomplissement des tests à **température ambiante** ! Ceci a lieu de préférence par prélèvement de ces réactifs du réfrigérateur un jour déjà avant l’analyse.
- Bien secouer les réactifs R1 et R4 avant l’utilisation !
- Ne sortir le réactif R2 du congélateur que juste avant l’utilisation, le faire décongeler entièrement puis le replacer immédiatement au congélateur.** Même lors du déroulement de plusieurs tests, toujours effectuer un stockage intermédiaire au congélateur.
- L’absorption des réactifs **R2 et R3** doit avoir lieu à l’aide de la seringue à microfilite **sous forme exempte de bulles d’air** !
- Rincer impérativement la seringue à micro-filtre après **chaque** opération de pipetage par absorption d’eau distillée à plusieurs reprises !
- Rincer l’adaptateur pour électrodes, le récipient de réaction et l’électrode à oxygène après **chaque** opération de mesure avec de l’eau distillée afin d’éviter des contaminations étrangères lors du prochain échantillonnage.
- Les récipients de réaction compris dans le kit de test sont des récipients réutilisables et peuvent être de nouveau utilisés après un rinçage à l’eau distillée.

Exécution :

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 (Etape de travail 2) et la mesure véritable de l’inhibition de la nitrification de l’échantillon ou de l’échantillon dilué (Etape de travail 5), une détermination de la demande en oxygène de l’échantillon ou de l’échantillon dilué (Etape 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 (Etape de travail 2)

DE = Demande de l’échantillon ou de l’échantillon dilué contenant des matières consommatrices d’oxygène (Etape de travail 4)

IN-E = Inhibition de la nitrification de l’échantillon ou de l’échantillon dilué (Etape de travail 5)

Etape de travail 1 : Préparation des bactéries oxydante au nitrite (Réactif *N-Tox* R2)

Le réactif *N-Tox* R2 ne devra être sorti du congélateur que juste avant le début du test, le décongeler **entièrement** (!) et tout d’abord l’homogénéiser en le secouant légèrement. Replacer le réactif *N-Tox* R2 dans le congélateur **directement** après en avoir versé dans la préparation de test !

Remarque : Même si elles sont stockées correctement, les bactéries dans le réactif N-Tox R2 perdent naturellement de leur activité à un âge avancé. Cela n’a cependant aucune conséquence sur le résultat de la mesure du test en % d’inhibition, car la proportion entre l’inhibition probable de l’échantillon en comparaison avec la consommation en oxygène de la solution de contrôle reste égale même en cas de baisse d’activité des bactéries.

Etape de travail 2 : Contrôle

- Placer l’adaptateur pour électrodes sur électrode O₂*. Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
- Agiter** vigoureusement le **réactif *N-Tox* R1** pour enrichissement en oxygène durant **30 s**, puis remplir le récipient de réaction jusqu’au trop-plein en **réactif *N-Tox* R1 sans formation de bulles d’air** (env. 7–8 mL).
- Immerger l’électrode O₂ 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 !**
- 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.
- Enlever le réactif *N-Tox* R2 du compartiment de réfrigération et procéder dans un premier temps à une homogénéisation en l’agitant brièvement. Ensuite, **ajout de 100 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. Replacer immédiatement le réactif *N-Tox* R2 dans le compartiment de réfrigération.
- Après 2 minutes** (et avant d’ajouter le réactif *N-Tox* R3), **relever** et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation de contrôle **O_{CO}** (concentration en O₂ de la préparation de contrôle au moment t = 0 minutes). **Important : Durant les 2 minutes et avant de pipeter le réactif N-Tox R3, bien rincer la seringue à micro-litre en faisant passer plusieurs fois de l’eau distillée !**
- Ensuite, **ajouter immédiatement 100 mL de réactif *N-Tox* R3** par la petite percée d’injection de l’adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre.
- Après 10 minutes**, relever et noter , relever et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation de contrôle **O_{C10}** (concentration en O₂ de la préparation de contrôle au moment t = 10 minutes).

* Pour des indications 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).

Etape de travail 3 : Préparation de l’échantillon

- 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.
- Régler la valeur pH avec 0,1 N NaOH ou 0,1 HCl sur **pH 7,8 ± 0,2**.
- 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).
- 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 *N-Tox* R4**.
- 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 (Etape de travail 4) ou pour déterminer l’inhibition de nitrification (Etape 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 **ΔO_{DE} = 0** !*

- Placer l’adaptateur pour électrodes sur électrode O₂*. Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
- 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).
- Immerger l’électrode O₂ 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 minutes** 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 !**
- 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 *N-Tox* R2 !**
- Après 2 minutes** (et avant d’ajouter le réactif *N-Tox* R3), relever et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l’échantillon **O_{DE0}** (concentration en O₂ de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l’échantillon au moment t = 0 minutes).
- Ensuite, **ajouter immédiatement 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.
- Après 10 minutes, relever** et noter , relever et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l’échantillon **O_{DE10}** (concentration en O₂ de la préparation pour déterminer la demande en oxygène de l’échantillon au moment t = 10 minutes).

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

- Placer l’adaptateur pour électrodes sur électrode O₂*. Placer le récipient avec le dispositif mélangeur et le placer sur le mélangeur magnétique.
- 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).
- Immerger l’électrode O₂ 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 minutes 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 !**
- 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.
- Enlever le réactif *N-Tox* R2 du compartiment de réfrigération et procéder dans un premier temps à une homogénéisation en l’agitant brièvement. Ensuite, **ajout de 100 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. Replacer immédiatement le réactif *N-Tox* R2 dans le compartiment de réfrigération.
- Après 2 minutes** (et avant d’ajouter le réactif *N-Tox* R3), relever et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation d’inhibition de nitrification de l’échantillon **O_{IN-E0}** (concentration en O₂ de la préparation d’inhibition de nitrification de l’échantillon au moment t = 0 minutes).
- Ensuite, **ajouter immédiatement 100 mL de réactif *N-Tox* R3** par la petite percée d’injection de l’adaptateur pour électrodes au moyen de la seringue à micro-litre.
- Après 10 minutes, relever** et noter, relever et noter la **concentration d’oxygène** de la préparation d’inhibition de nitrification de l’échantillon **O_{IN-E10}** (concentration en O₂ de la préparation d’inhibition de nitrification de l’échantillon au moment t = 10 minutes).

Etape de travail 6 : Evaluation

(1) Consommation d’oxygène de dans la préparation de contrôle :

$$\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$$

(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 :

$$\Delta O_{IN-E} = O_{IN-E0} - O_{IN-E10}$$

* ΔO_{DE} = 0, en cas d’absence de demande en O₂ de l’échantillon

Corrigée en oxygène corregido en la solución prueba, tomando en cuenta el consumo de oxígeno: **ΔO_P = ΔO_{IN-P} - ΔO_{DE}**

Résultat de test:

% d’inhibition de l’oxydation au nitrite = [(ΔO_C - ΔO_P) / ΔO_C] x 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 photocopiée sans problème dans le but d’une propre utilisation.

* Pour des indications 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).

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 1:2 on mesure une inhibition de 35 % et si sur un échantillon dilué à 1:4 on mesure une inhibition de 15 %, alors dans ce cas la valeur G_{IN} serait = 4.

Elimination des déchets :

La boîte en styropore avec les flacons carrés et les cuvettes rondes vides peut être sans problème éliminée par les bords des ordures ménagères normales. Les préparations d’essai peuvent être vidées sans problèmes dans l’évier; des restrictions peuvent survenir lorsque l’échantillon contient des substances nuisibles à la santé ou toxiques et sont assujetties à des obligations particulières en matière d’élimination des déchets..

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Neumann-Neander-Str. 6–8 · 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

REF 970002

03.21

es

BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *N-Tox*

Método:

Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibidor específico de productos contenidos en pruebas procedentes de la nitrificación oxidativa en el marco de la nitrificación microbiana con la ayuda de cepas bacterianas definidas, preferentemente de la especie *Nitrobacter*. 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.

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

Contenido del kit de reactivos:

5 recipientes de reacción	1 botella, blanca con 5 mL <i>N-Tox</i> R3
1 botella, color natural con 100 mL <i>N-Tox</i> R1	1 botella, negra con 100 mL <i>N-Tox</i> R4
1 cubeta redonda con 2 mL <i>N-Tox</i> R2	

Precauciones de seguridad:

Este juego para la prueba rápida no contiene ningún producto peligroso de señalización obligatoria. Los microorganismos nitrificantes utilizados pertenecen según la hoja de instrucciones B006 1/92 ZH 1/346 de las sociedades profesionales de la industria química (Alemania) al grupo de riesgo 1, es decir, según los conocimientos científicos no existe **ningún** peligro para las personas ni para los animales vertebrados.

Almacenamiento:

Guarde en congelador o bien todo el kit BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *N-Tox*, en cualquier caso el **reactivo *N-Tox* R2 a -20 ± 2 °C**. La caja con los reactivos restantes puede guardarse en frío para + 2 °C hasta + 8 °C. Tenga en cuenta la fecha de caducidad impresa. El reactivo R2 extraígalo del congelador inmediatamente antes de su uso, deje descongelar y homogeneice. Incluso con la realización de varias pruebas guarde entre medias en el congelador.

¡Por favor, antes de efectuar una prueba lea detenidamente y siga siempre las instrucciones siguientes!

- Los siguientes accesorios serán necesarios para efectuar una correcta prueba: 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.
- El **contenido de oxígeno** de la prueba o de la dilución de la prueba deberá ser, para efectuar una prueba óptima, de **> 8,0 mg/L de O₂**. En caso necesario previamente enriquezca la prueba (sin diluir) ventilando brevemente o por agitación fuerte.
- ¡La **velocidad del agitador magnético** influye, de forma expresiva, en la tasa de consumo de oxígeno! Por tanto, todas las mediciones de la misma serie deben ser realizadas a una velocidad constante. Velocidad de agitación ideal: de 200 a 400 r.p.m.
- Los reactivos **R1, R3 y R4** póngalos a la **temperatura ambiental** antes de efectuar la prueba! Esto se hace favorablemente sacando estos reactivos ya el día anterior al del análisis fuera del frigorífico.
- ¡Los reactivos R1 y R4 ágítelos antes de usarlos!
- Retire el reactivo R2 inmediatamente antes del uso, descongélelo completamente y después, almacénelo en el congelador de nuevo.** Entre varios tests consecutivos, también coloque el reactivo en el congelador.
- ¡La extracción de los reactivos **R2 y R3** con la ayuda de la jeringa de microlitro debe hacerse **libre de burbujas!**
- ¡Lave necesariamente las jeringas de microlitro después de **cada** pipeteado aspirando varias veces agua destilada!
- El adaptador de electrodos, el recipiente de reacción y los electrodos de oxígeno lávelos con agua destilada después de **cada** medida para evitar contaminaciones externas al medir la prueba siguiente.
- Los recipientes contenidos en el juego de prueba son recipientes de varios usos y pueden utilizarse de nuevo después de lavarlos con agua destilada.

Procedimiento:

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 → SC-S → NI-S → C → SC-S → NI-S → C → SC-S → NI-S → 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 oxidantes nitrificantes (Reactivo *N-Tox* R2)

El reactivo *N-Tox* R2 se retira del refrigerador sólo inmediatamente antes de comenzar el test, descongelado **completamente** (!) y homogeneizado agitándolo brevemente. **Directamente después la adición**, el reactivo *N-Tox* R2 ¡vuelve a ser almacenado en el congelador!

Observación: En función del envejecimiento, las bacterias no reactivan pierden continuamente un poco de su actividad. Este proceso, sin embargo, no influye de forma alguna en la determinación de la inhibición en por ciento, ya que la relación entre la posible inhibición de la prueba y el consumo de oxígeno continúa igual, a pesar de la disminución de la actividad bacteriana.

Paso de trabajo 2: Control

- Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O₂*. Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
- Agite fuertemente el reactivo *N-Tox* R1** para el enriquecimiento de oxígeno durante **30 s** y a continuación llene el recipiente de reacción hasta su rebosa **libre de burbujas** con el **reactivo *N-Tox* R1** (aprox. 7–8 mL).
- Introduzca el electrodo O₂ 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 **ágítelo** 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!
- 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.
- Saque el reactivo del congelador *N-Tox* R2 descongélelo **completamente** y homogeneice agitándolos brevemente. A continuación **añada 100 µL de reactivo *N-Tox* R2** por medio de el pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo el reactivo *N-Tox* R2 en el congelador.
- Haga la lectura después de 2 minutos** (¡ antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3 !) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de control O_{CO} (concentración de O₂ del preparado de control en el momento t = 0 min).
*Importante: Durante los 2 minutos y antes de que pueda extraerse con la pipeta el reactivo *N-Tox* R3 lave bien la jeringa de microlitro aspirando varias veces en agua destilada!*
- A continuación **adición inmediata de 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.
- Lea después de 10 minutos** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de control O_{C10} (Concentración de O₂ del preparado de control en el momento = 10 min)

* 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).

Paso de trabajo 3 : Preparación de prueba

- En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa **no estéerl** con la ayuda de los filtro (plegables) comerciales normales, por centrifugación y métodos similares.
- Ajuste el valor del pH de la prueba** con la ayuda de 0,1 NaOH ó 0,1 NHCl al pH **7,8 ± 0,2**.
- Microfilitre 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 microfiora natural ya existente que puede conducir a resultados falsos.
- Adicione a un recipiente apropiado (p. ej., un recipiente químico de tamaño suficiente) **16 mL de la prueba microfiltrada y 4 mL del reactivo *N-Tox* R4**.
- Mezcle la prueba y ágítela 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 **ΔO_{CO-P} = 0!***

- Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O₂*. Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
- 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**.
- 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 **ágítelo** 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!
- 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 del reactivo *N-Tox* R2!
- Haga la lectura después de 2 minutos** (¡antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de la prueba O_{CO-P} (Concentración de O₂ en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t = 0 min).
- A continuación **adición inmediata de 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.
- Lea después de 10 minutos** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de la prueba O_{CO-P10} (Concentración de O₂ 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

- Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O₂*. Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
- 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**.
- Introduzca el electrodo O₂ 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 **ágítelo** 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!
- 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.
- Saque el reactivo del congelador *N-Tox* R2 descongélelo **completamente** y homogeneice agitándolos brevemente. A continuación **añada 100 µL de reactivo *N-Tox* R2** por medio de el pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo el reactivo *N-Tox* R2 en el congelador.
- Haga la lectura después de 2 minutos** (¡antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3!) y anote la concentración de oxígeno en el preparado de la prueba O_{IN-P} (Concentración de O₂ en la solución prueba para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t = 0 min).
- A continuación **adición inmediata de 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.
- Lea después de 10 minutos** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de la prueba O_{IN-P10} (Concentración de O₂ en la solución prueba para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t = 10 min).

Paso de trabajo 6: Valoración

(1) Consumo de oxígeno en el preparado de control:

$$\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$$

(2) Consumo de oxígeno de la prueba:

$$\Delta O_{CO-P} = O_{CO-P} - O_{CO-P10}$$

(3) Consumo de oxígeno en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en la prueba

$$\Delta O_{IN-P} = O_{IN-P} - O_{IN-P10}$$

* ΔO_{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: ΔO_P = ΔO_{IN-P} - ΔO_{CO-P}

Resultado:

% de inhibición de la oxidación nitrito = [(ΔO_C - ΔO_P) : ΔO_C] x 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 970 101).

Interpretación de los resultados:

Los valores de inhibición se interpretan de la forma siguiente:

0–10 % de inhibición	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 1:2, y una inhibición de 15 % en la prueba diluida a 1:4, sería el valor
 $G_{IN} = 4$.

Eliminación:

La caja de estiropor con los tubos y las cubetas puede evacuarse sin problemas con la basura doméstica. Los preparados de prueba pueden evacuarse sin problemas por el desagüe. Limitaciones pueden existir cuando la prueba contenga substancias especiales de evacuación obligatoria peligrosas para la salud o venenosas. Para la evacuación correcta de tales preparados de prueba es responsable el usuario de acuerdo con las normativas vigentes.

REF 970002

03.21

nl

BioFix® Nitrificatieremtest *N-Tox*

Methode:

Amperometrische methode voor de bepaling van de specifieke remmende werking van monsterbestanddelen op de nitrietoxidatie in het kader van de microbiële nitrificatie met behulp van gedefinieerde bacteriestammen, bij voorkeur van de soort *Nitrobacter*. De resultaten worden aangegeuid als % remming van het zuurstofverbruik in de monsteroplossing in vergelijking met een ongeremde controle.

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

Inhoud van reagensset:

5 reactievaten 1 fles, wit met 5 mL *N-Tox* R3
 1 fles, naturel met 100 mL *N-Tox* R1 1 fles, zwart met 100 mL *N-Tox* R4
 1 rondcuvette met 2 mL *N-Tox* R2

Voorzorgsmaatregelen:

Deze sneltest bevat geen gevaarlijke stoffen waarvoor een markeringsplicht geldt. De gebruikte nitrificerende micro-organismen behoren volgens het blad met toelichtingen en verklaringen B006 1/92 ZH 1/346 van de beroepsorganisatie van de chemische industrie (Duitsland) tot risicogroep 1, d. w.z. er bestaat volgens de huidige stand van de wetenschap geen risico voor mensen en gewerveld dieren.

Bewaring:

Ofwel de volledige testkit BioFix® Nitrificatieremtest *N-Tox*, maar in elk geval **reagens *N-Tox* R2 ijskoud bewaren op -20 ± 2 °C**. De box met de overige reagentia kan ook koel bewaard worden op +2 °C tot +8 °C. De vermelde vervaldatum in acht nemen. Reagens *N-Tox* R2 pas **onmiddellijk** voor gebruik uit het vriesvak nemen, ontdooien en homogeniseren. Ook bij uitvoering van meerdere tests tussendoor steeds in het vriesvak bewaren.

Voor uitvoering van een test de volgende aanwijzingen aandachtig lezen en absoluut in acht nemen!

- Voor de correcte uitvoering van de test heeft u volgende bijkomende toebehoren nodig: Starterset voor BioFix® Nitrificatieremtests (REF 970101), CHROMAFIL® wegwerffilter onsteriel, poriegrootte 0,45 µm (REF 91652), zuurstofmeter, magneetroerder, statief met klemmen, zuigerpipetten met tap.
- Het **zuurstofgehalte van de proef** of van de proefverduunning moet **> 8,0 mg/L O₂** bedragen voor een optimale uitvoering van de test. Eventueel door kort aëren of krachtig schudden de proef-/verduunning vermijen met zuurstof.
- De **roersnelheid van de magneetroerder** heeft een significante invloed op het maat van de zuurstofvorming! Daarom alle etingen van een testreeks met een constant ingestelde roersnelheid uitvoeren. Optimale roersnelheid: 200 tot 400 rpm.
- De reagentia **R1, R3 en R4** voor de uitvoering van de test op **kamertemperatuur** brengen! Dit gebeurt best door deze reagentia reeds de dag voor de analyse uit de koelkast te halen.
- De reagentia **R1 en R4** kort schudden!
- Reagens R2 eerst direct voor het gebruik uit het vriesvak nemen, geheel laten ontdooien en aansluitend onmiddellijk weer ijskoud bewaren.** Ook bij een uitvoering van meerdere testen altijd in het vriesvak tijdelijk bewaren.
- Het optrekken van de reagentia **R2 en R3** met behulp van de micrometerspuit moet gebeuren **zonder luchtbellenvorming!**
- De micrometerspuit steeds na **elke** pipetteerhandeling spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!
- De elektrodeadapter, het reactievat en de zuurstofelektrode na **elke** meting spoelen met gedestilleerd water om contaminatie door vreemde stoffen bij de meting van de volgende proef te voorkomen!
- De reactievaten uit de testkit zijn vaten voor herhaaldelijk gebruik en kunnen na spoeling met gedestilleerd water opnieuw gebruikt worden.

Procedure:

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

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. monsterverduunning (Arbeidsstap 5) aanvullend een bepaling van de zuurstof-eigenvertering van het monster resp. monsterverduunning (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. monsterverduunning (Arbeidsstap 4)

NR-M = Nitrificatieremming van het monster resp. monsterverduunning (Arbeidsstap 5)

Arbeidsstap 1: Voorbereiding van de nitriëroxyderende bacteriën (Reagens *N-Tox* R2)

Het reagens *N-Tox* R2 wordt eerst direct voor het testbegin uit het vriesvak genomen, **geheel** (!) ontdooid en door kort schudden vooreerst gehomogeniseerd. **Direct na het toevoegen** bij de desbetreffende testmenging het reagens *N-Tox* R2 weer terug in het vriesvak zetten!

*Aanwijzing: Ook bij een correct bewaren verliezen de bacteriën in het reagens *N-Tox* R2 met toenemende ouderdom natuurlijkerwijze aan activiteit. Dit heeft echter geen invloed op het meetresultaat van de test in % remming, omdat de adequaatheid tussen mogelijke remming van de monsteraanmenging in vergelijking met het zuurstofverbruik in de controleaanmenging ook bij afnemende activiteit van de bacteriën altijd gegarandeerd blijft.*

Arbeidsstap 2: Controle

- Elektrodeadapter op O₂-elektrode steken*. Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
- Reagens *N-Tox* R1** gedurende **30 s krachtig schudden** om het te vermijen met zuurstof en vervolgens het reactievat **zonder luchtbellenvorming maximaal vullen met reagens *N-Tox* R1 (ca. 7–8 mL)**.
- O₂-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het **lichtdicht** 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!
- 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.
- Reagens *N-Tox* R2 uit het vriesvak nemen, **geheel** laten ontdooien en door kort schudden eerst homogeniseren. Vervolgens **100 µL reagens *N-Tox* R2 toevoegen** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit. Reagens *N-Tox* R2 onmiddellijk terug in het vriesvak plaatsen.
- Na 2 minuten** (en voor toevoeging van reagens *N-Tox* R3) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de controlebereiding **O_{CO}** (O₂-concentratie van de controlebereiding op het tijdstip t = 0 min).
*Belangrijk: Tijdens de 2 minuten en alvorens reagens *N-Tox* R3 gepipetteerd wordt, de micrometerspuit goed spoelen door het herhaaldelijk optrekken van gedestilleerd water!*
- Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *N-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit.
- Na 10 minuten aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de controlebereiding **O_{C10}** (O₂-concentratie van de controlebereiding op het tijdstip t = 10 min).

* 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).

Arbeidsstap 3: Monstervoorbereiding

- Bij sterk vertroebelde monsters eerst een **niet-steriele** voorfiltratie uitvoeren met behulp van een gangbare (vrouw-) filter, door centrifugering of vergelijkbare methoden.
- 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**.
- 20 mL monster** met behulp van CHROMAFIL® wegwerffilters, 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).
- Men geeft in een geschikt vat (bijv. beker van toereikende grootte) **16 mL fijn gefiltreerde monsteroplossing** en **4 mL reagens *N-Tox* R4**.
- 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 berekening van de nitrificatieremming wordt in dit geval de variabele **ΔO_{ZE-M} = 0** gezet !*

- Elektrodeadapter op O₂-elektrode steken*. Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
- Reactievat **zonder luchtbellenvorming** maximaal vullen met **monsteroplossing pH 7,8** (ca. 7–8 mL) uit arbeidsstap 3.
- O₂-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het **lichtdicht** 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!
- 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 reagens *N-Tox* R2!
- Na 2 minuten** (en voor toevoeging van reagens *N-Tox* R3) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing **O_{ZE-M0}** (O₂-concentratie in de eigenverteeringsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 0 min).
- Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *N-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit.
- Na 10 minuten aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing **O_{ZE-M10}** (O₂-concentratie in de eigenverteeringsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 10 min).

Arbeidsstap 5: Nitrificatieremming van het monster

- Elektrodeadapter op O₂-elektrode steken*. Reactievat voorzien van roervlo en op de magneetroerder plaatsen.
- Reactievat **zonder luchtbellenvorming** maximaal vullen met **monsteroplossing pH 7,8 (ca. 7–8 mL)** uit arbeidsstap 3.
- O₂-elektrode met opgestoken elektrodeadapter voorzichtig in het reactievat dompelen tot het **lichtdicht** 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!
- 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.
- Reagens *N-Tox* R2 uit het vriesvak nemen, **geheel** laten ontdooien en door kort schudden eerst homogeniseren. Vervolgens **100 µL reagens *N-Tox* R2** toevoegen door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit. Reagens *N-Tox* R2 onmiddellijk terug in het vriesvak plaatsen.
- Na 2 minuten** (en voor toevoeging van reagens *N-Tox* R3) **aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing **O_{NR-M0}** (O₂-concentratie in de nitrificatieremmingsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 0 min).
- Vervolgens **onmiddellijke toevoeging van 100 µL reagens *N-Tox* R3** door het kleine injectiegat van de elektrodeadapter met behulp van een micrometerspuit.
- Na 10 minuten aflezen** en noteren van de **zuurstofconcentratie** in de monsteroplossing **O_{NR-M10}** (O₂-concentratie in de nitrificatieremmingsaanmenging van het monster op het tijdstip t = 10 min).

Arbeidsstap 6: Analyse

(1) Zuurstofverbruik in de controlebereiding:

$$\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$$

(2) Zuurstof-eigenvertering van het monster:

$$\Delta O_{ZE-M}^{\#} = O_{ZE-M0} - O_{ZE-M10}$$

(3) Zuurstofverbruik in nitrificatieremmingsaanmenging van het monster:

$$\Delta O_{NR-M} = O_{NR-M0} - O_{NR-M10}$$

#: ΔO_{ZE-M} = 0, wanneer geen O₂-eigenvertering van het monster voorhanden

Gecorrigeerd zuurstofverbruik in de monsteraanmenging met inachtneming van de zuurstof-eigenvertering: **ΔOM = ΔO_{NR-M} – ΔO_{ZE-M}**

Resultaat:

% remming van de nitriëtoxidatie = [(ΔO_C – ΔO_M) : ΔO_C] 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).

Interpretatie van de meetresultaten:

De verkregen remwaarden kunnen zoals volgt worden geïnterpreteerd:

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

Als verdere, **normonaafhankelijke** 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 bacterienest naar DIN EN ISO 11348), ook als **O_{NR}-waarde** worden aangegeven. Deze is gedefinieerd als reciproke waarde van de eerste verduunningstrap van het monster, waarbij de remming van de nitrificatie voor de eerste maal kleiner als 20 % is.

Voorbeeld: Wordt bij een 1:2 verduunning van een monster een remming van 35 % vastgesteld en bij een 1:4 verduunning een remming van 15 %, dan zou in dit geval de G_{NR}-waarde = 4 zijn.

Afvalverwerking:

De piepschuimbox met de lege vierkante flessen en ronde cuvetten kan zonder problemen met het normale huisvuil meegegeven worden. De testbepalingen kunnen probleemloos door de afvoer gegoten worden. Er kunnen beperkingen ontstaan wanneer de proef schadelijke of giftige substanties bevat waarvoor speciale verwerkingsvoorschriften bestaan. De gebruiker is zelf verantwoordelijk voor de correcte verwerking van zulke testbepalingen overeenkomstig de daarvoor geldende richtlijnen en bepalingen.

REF 970002

03.21

it

BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione *N-Tox***Metodo:**

Metodo amperometrico di determinazione della specifica azione inibitoria dei componenti delle prove sull'ossidazione del nitrito in correlazione con la nitrificazione microbica ottenuta mediante determinati ceppi batterici appartenenti preferibilmente alla specie *Nitrobacter*. I risultati vengono espressi in % d'inibizione del consumo di ossigeno nella soluzione di prova a confronto con una soluzione di controllo non inibita.

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

Contenuto set di reagenti:

5 recipienti di reazione	1 bottiglia, bianca con 5 mL <i>N-Tox</i> R3
1 bottiglia, colore naturale con 100 mL <i>N-Tox</i> R1	1 bottiglia, nera con 100 mL <i>N-Tox</i> R4
1 cuvetta rotonda con 2 mL <i>N-Tox</i> R2	

Avvertenze di pericolo:

Questo test di rapida esecuzione non contiene sostanze pericolose soggette ad obbligo di contrassegnatura. I microorganismi nitrificanti utilizzati sono classificati nella scheda descrittiva B006 1/92 ZH 1/346 della Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie (Cassa mutua dell'industria chimica, Germania) come appartenenti alla classe di rischio 1, ovvero secondo le attuali conoscenze scientifiche non comportano alcun rischio per l'uomo e per i vertebrati.

Magazzinaggio:

Il reagente *N-Tox R2* deve essere conservato in frigorifero ad una temperatura compresa tra -20 ± 2 °C. La confezione con gli ulteriori reagenti può anche essere conservata in un luogo fresco, ossia ad una temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C. Rispettare la data di scadenza stampata sulla confezione. Il reagente R2 deve essere estratto dal frigorifero soltanto pochi istanti prima di essere utilizzato. Dopodiché deve essere sbrinato ed omogeneizzato. Conservare sempre in frigorifero il reagente, anche durante l'esecuzione di molteplici test.

Si prega di leggere e rispettare scrupolosamente i seguenti avvisi prima di eseguire il test!

- Per una regolare esecuzione del test sono necessari i seguenti accessori: 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.
- Per un'ideale esecuzione del test è necessario un **tenore di ossigeno della prova > 8,0 mg/L O₂**. Ove necessario, ossigenare la prova mediante una breve ventilazione oppure agitandola energicamente (soluzione) prima dell'uso.
- La **velocità di miscelazione dell'agitatore magnetico** ha un'influenza significativa sul grado di consumo di ossigeno! Pertanto, si raccomanda di effettuare tutte le rilevazioni di una serie alla stessa velocità. Velocità di miscelazione ottimale: 200–400 rpm
- I reagenti **R1, R3 e R4** devono essere portati a **temperatura ambiente** prima dell'esecuzione dei test! Per garantire questa condizione è opportuno estrarre dal frigorifero questi reagenti già un giorno prima dell'analisi.
- Agitare brevemente i reagenti R1 e R4 prima dell'uso!
- Togliere il reagente R2 dal freezer solo immediatamente prima dell'utilizzo, lasciarlo scongelare completamente e infine riporlo nuovamente in freezer.** Conservare in freezer anche quando si effettuano diversi test.
- L'aspirazione dei reagenti **R2 e R3** con la siringa micrometrica deve avvenire senza inclusioni di **bolle d'aria!**
- È assolutamente indispensabile lavare la siringa micrometrica dopo **ogni** pipettaggio caricandola più volte con acqua distillata!
- Dopo **ogni** processo di misurazione si devono lavare con acqua distillata l'adattatore degli elettrodi, il recipiente di reazione e l'elettrodo dell'ossigeno al fine di prevenire contaminazioni esterne durante la misurazione della successiva prova.
- I recipienti di reazione contenuti nel kit possono essere riutilizzati dopo essere stati lavati con acqua. The reaction vessels contained in the test kit can be reused after rinsing with distilled water.

Procedimento:

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 inerte 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 inerte 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 inerte alla prova stessa:

C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C →
 C = rilevazione di controllo (2ª fase)

Sequenza di rilevazioni raccomandate **senza** stima del consumo di ossigeno inerte 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 inerte 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 ossidanti del nitrito (Reagente *N-Tox* R2)

Togliere dal freezer il reagente *N-Tox R2* solo immediatamente prima dell'inizio del test, lasciarlo scongelare **completamente** (!) e omogeneizzarlo agitandolo brevemente. Riporre il reagente *N-Tox R2* nuovamente nel freezer dopo averlo aggiunto alla prova!

*Importante: Anche a fronte di una conservazione appropriata, l'attività dei batteri contenuti nel reagente *N-Tox R2* diminuisce naturalmente con il passare del tempo. Questo dato non ha alcun impatto sul risultato della rilevazione del test in termini di inibizione percentuale, poiché il rapporto di proporzionalità tra la possibile inibizione della prova rispetto al consumo di ossigeno nel controllo persiste anche in presenza di una riduzione dell'attività dei batteri.*

2ª fase: Controllo

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O₂*. Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- Agitare energicamente per 30 s il Reagente *N-Tox* R1** per ossigenarlo e riempire quindi il recipiente di reazione con il **Reagente *N-Tox* R1** (circa 7–8 mL) fino a farlo traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
- 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!
- 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.
- Togliere dal freezer il reagente *N-Tox* R2, lasciarlo scongelare **completamente** e omogeneizzare agitandolo brevemente. Dopodiché **aggiungere 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 il reagente *N-Tox* R2 nel freezer.
- Rilevare il risultato dopo 2 minuti** (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox* R3 !) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di controllo O_{CO-P} (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 0 min).
*Importante: Durante questi 2 minuti e prima di pipettare il Reagente *N-Tox* R3 si deve lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!*
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di Reagente *N-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di controllo O_{C10} (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 10 min).

* 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).

3ª fase: Preparazione della prova

- 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.
- Regolare il valore di pH della prova sul pH **7,8 ± 0,2** aggiungendo 0,1 N NaOH oppure 0,1 N HCl.
- 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).
- Versare in una provetta appropriata (p.es., becher di capacità sufficiente) **16 mL di soluzione di prova filtrata finemente e 4 mL di reagente *N-Tox* R4**.
- 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 $\Delta O_{CO-P} = 0!$*

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O₂*. Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- 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**.
- 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!
- 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 il reagente *N-Tox* R2 !
- Rilevare il risultato dopo 2 minuti** (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox* R3!) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova O_{CO-P0} (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min).
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente *N-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di prova O_{CO-P10} (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 10 min).

5ª fase: Inibizione del processo di nitrificazione della prova

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O₂*. Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- 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**.
- 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!
- 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.
- Togliere dal freezer il reagente *N-Tox* R2, lasciarlo scongelare **completamente** e omogeneizzare agitandolo brevemente. Dopodiché **aggiungere 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 il reagente *N-Tox* R2 nel freezer.
- Rilevare il risultato dopo 2 minuti** (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox* R3!) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova O_{IN-P0} (Concentrazione di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova nel momento t = 0 min).
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di Reagente *N-Tox* R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di prova 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:

$$\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$$

(2) Consumo di ossigeno inerte alla prova stessa:

$$\Delta O_{CO-P}^{\#} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$$

(3) Consumo di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova:

$$\Delta O_{IN-P} = O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$$

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

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

Risultato:

% di inibizione dell'ossidazione del nitrito = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

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).

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 G_{IN}**, 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 1:2 della prova si registra un'inibizione del 35 % e per un rapporto di 1:4 la percentuale di inibizione è del 15%, il valore G_{IN} = 4

Smaltimento:

Il contenitore in polistirolo con le bottiglie rettangolari vuote e le cuvette rotonde può essere facilmente smaltito assieme ai normali rifiuti domestici. Le soluzioni di prova possono essere facilmente versate nello scarico del lavandino. Problemi di smaltimento possono sorgere se la prova contiene sostanze nocive, velenose o richiedenti speciali processi di smaltimento. L'utilizzatore è responsabile per un regolare smaltimento di queste soluzioni in conformità alle vigenti direttive e prescrizioni.

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

Controllo (2 ^a fase)			Medida de prueba								Resultado
			Denominazione della prova	Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (4 ^a fase)			Inibizione della nitrificazione (5 ^a fase)			Consumo di O ₂ rettificato	
O _{CO} [mg/L]	O _{C10} [mg/L]	ΔO _C [mg/L] = O _{CO} - 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] = ΔO _{IN-P} - ΔO _{CO-P}	Inibizione [%] = [(ΔO - ΔO _P) : ΔO] x 100

O_{CO}: 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 t₀ 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