REF 970001 **12.24** de

BioFix® Nitrifikationshemmtest *A-Tox*

Methode:
Amperometrische Methode zur Bestimmung der spezifischen Hemmwirkung von Probeninhaltsstoffen auf die Ammoniakoxidation im Rahmen der mikrobiellen Nitrifikation mit Hilfe definierter Bakterienstämme, vorzugsweise der Gattung *Nitrosomonas*. 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 mit 100 mL *A-Tox* R1
1 Rundküvette mit 2 mL *A-Tox* R2
1 Flasche mit 5 mL *A-Tox* R3
1 Flasche mit 100 mL *A-Tox* R4

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 Wirbeltiere.

Lagerung:
Der BioFix® Nitrifikationshemmtest *A-Tox* ist im Kühlschrank zu lagern (R2 > 6 °C!). **Nicht Einfrieren!** Das aufgedruckte Verfalldatum beachten. **Reagenz *A-Tox* R2 auch bei Durchführung mehrerer Teste immer im Kühlschrank zwischenlagern.**

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

1. Folgendes weiteres Zubehör wird zu einer ordnungsgemäßen Testdurchführung benötigt:
   Starter-Set für BioFix® Nitrifikationshemmteste (REF 970101), CHROMAFIL® Einmalfilter (REF 91652), Sauerstoffmessgerät, Magnetrührer (REF 970115), Stativ mit Klemmen, Kolbenhubpipetten mit Spitzen
2. Der **Sauerstoffgehalt der Probe** bzw. der Probenverdünnung sollte für eine optimale Testdurchführung > **8,0 mg/L O_2** betragen. Gegebenenfalls durch kurzes Belüften oder kräftiges Schütteln die Probe(-nverdünnung) vorab mit Sauerstoff anreichern.
3. 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
4. **Reagenz R2 bereits im Laufe des Tages vor der geplanten Testdurchführung 4 bis 6 mal durch Schütteln reaktivieren (weiterhin jedoch im Kühlschrank > 6 °C lagern!).**
5. Die Reagenzien **R1, R3 und R4** vor der Durchführung der Teste auf **Raumtemperatur** bringen!
   Dies geschieht am besten dadurch, dass man diese Reagenzien bereits am Tag vor der Analyse dem Kühlschrank entnimmt.
6. Die Reagenzien R1 und R4 vor Gebrauch kurz schütteln!
7. **Reagenz R2 erst unmittelbar vor Gebrauch dem Kühlfach entnehmen und anschließend sofort wieder kühl lagern.** Auch bei Durchführung mehrerer Teste immer im Kühlschrank zwischenlagern.
8. Das Aufziehen der Reagenzien **R2 und R3** mit Hilfe der Mikroliterspritze muss **luftblasenfrei** erfolgen!
9. Unbedingt die Mikroliterspritze nach **jedem** Pipettiervorgang durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser spülen!
10. Den Elektroden-Adapter, das Reaktionsgefäß und die Sauerstoffelektrode nach **jedem** Messvorgang mit destilliertem Wasser spülen, um Fremdkontaminationen bei Messung der nächsten Probe zu vermeiden.
11. 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 spätestens jeder zweiten Probenmessung (Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe bzw. Bestimmung der Nitrifikationshemmung der Probe) wieder eine neue Kontrollmessung durchzuführen!
*Aufgrund des diesem Schnelltest als Messgröße zugrundeliegenden Prinzips der Sauerstoffmessung können **Proben mit sauerstoffzehrenden Inhaltsstoffen** die Messergebnisse verfälschen und potentiell nitrifikationshemmende Wirkungen überdecken. Zur Kompensation solcher sauerstoffzehrenden Effekte muss neben einer Kontrollmessung (Arbeitsschritt 2) und der eigentlichen Messung der Nitrifikationshemmung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 5) zusätzlich eine Bestimmung der Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe bzw. Probenverdünnung (Arbeitsschritt 4) durchgeführt werden, die bei der Berechnung des Endergebnisses einbezogen wird.*

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

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

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

Arbeitsschritt 1: Vorbereitung der ammoniakoxidierenden Bakterien (Reagenz *A-Tox* R2)

Aus Gründen der Reaktivierung von Reagenz *A-Tox* R2 empfiehlt sich die Durchführung des BioFix® Nitrifikationshemmtestes *A-Tox* immer am Nachmittag eines Arbeitstages!

Zur optimalen Testdurchführung sollte Reagenz *A-Tox* R2 folgendermaßen vorbehandelt werden:

Ein Tag vor Testdurchführung: Reagenz *A-Tox* R2 im Laufe des Tages vier- bis sechsmal durch kurzes Schütteln (z. B. 15 s auf Vortex-Reagenzglasschüttler) reaktivieren und homogenisieren (weiterhin jedoch im Kühlschrank lagern, aber nicht unter 6 °C!).

Am Tag der Testdurchführung: Beginnend etwa 3 Stunden vor Testbeginn bis zum Start des Testes Reagenz *A-Tox* R2 mehrmals (optimal: etwa 30 min-Takt) durch kurzes Schütteln (z. B. 15 s auf Vortex-Reagenzglasschüttler) reaktivieren und homogenisieren (weiterhin jedoch im Kühlschrank lagern!).

Hinweis: Die Aktivität von Reagenz A-Tox R2 (messbar als Sauerstoffverbrauch im Kontrollansatz über 10 min) hängt sehr stark vom Ausmaß der beschriebenen Reaktivierung ab. Je intensiver die Vorbereitung von Reagenz A-Tox R2 ausfällt, desto aktiver werden die Bakterien und desto höher ist die Sauerstoffzehrung im Kontrollansatz. Unabhängig davon verlieren jedoch die Bakterien in Reagenz A-Tox R2 mit zunehmendem Alter natürlicherweise etwas 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

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.*
   Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. **Reagenz *A-Tox* R1** zur Sauerstoffanreicherung für **30 s kräftig schütteln** und anschließend das Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Reagenz *A-Tox* R1** füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit 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!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.
5. Reaktiviertes Reagenz *A-Tox* R2 (siehe Arbeitsschritt 1) dem Kühlfach entnehmen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R2** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Reagenz *A-Tox* R2 sofort wieder ins Kühlfach (> 6 °C) zurückstellen.
6. **Nach 2 min** (und vor Zugabe von Reagenz *A-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K0} (O_2-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 0 min).
   ***Wichtig:** Während der 2 min und bevor Reagenz A-Tox R3 pipettiert wird, die Mikrolitерspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!*
7. Anschließend **sofort Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
8. **Nach 10 min Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Kontrollansatz O_{K10} (O_2-Konzentration des Kontrollansatzes zum Zeitpunkt t = 10 min).

* 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

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

Arbeitsschritt 4: Sauerstoff-Eigenzehrung der Probe

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

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.*
   Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit 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!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.

Wichtig: Es wird kein Reagenz *A-Tox* R2 zugegeben!

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

1. Elektroden-Adapter auf O_2-Elektrode aufstecken.*
   Reaktionsgefäß mit Rührfisch versehen und auf Magnetrührer plazieren.
2. Reaktionsgefäß bis zum Überlaufen **luftblasenfrei** mit **Probelösung, pH 7,8** aus Arbeitsschritt 3 füllen (ca. 7 – 8 mL).
3. O_2-Elektrode mit 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!
4. In der Zwischenzeit die gesamte Oberfläche des Elektroden-Adapters und insbesondere die beiden Einstichbohrungen zum luftdichten Abschluss mit destilliertem Wasser (z. B. mit Hilfe einer Spritzflasche) benetzen.
5. Reaktiviertes Reagenz *A-Tox* R2 (siehe Arbeitsschritt 1) dem Kühlfach entnehmen und durch kurzes Schütteln zunächst homogenisieren. Anschließend **Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R2** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze. Reagenz *A-Tox* R2 sofort wieder ins Kühlfach (> 6 °C) zurückstellen.
6. **Nach 2 min** (und vor Zugabe von Reagenz *A-Tox* R3!) **Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{NH-P0} (O_2-Konzentration des Nitrifikationshemmungsansatzes der Probe zum Zeitpunkt t = 0 min).
   ***Wichtig:** Während der 2 min und bevor Reagenz A-Tox R3 pipettiert wird, die Mikrolitерspritze durch mehrmaliges Aufziehen von destilliertem Wasser gut spülen!*
7. Anschließend **sofort Zugabe** von **100 µL Reagenz *A-Tox* R3** durch kleine Injektionsbohrung des Elektroden-Adapters mit Hilfe einer Mikroliterspritze.
8. **Nach 10 min Ablesen** und Notierung der **Sauerstoffkonzentration** im Probenansatz O_{NH-P10} (O_2-Konzentration des Nitrifikationshemmungsansatzes der Probe 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 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 O_2-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 Ammoniakoxidation = $[(\Delta O_K - \Delta O_P) : \Delta O_K] \times 100$

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

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

< 10 % Hemmung (auch negative Werte)	Probe nicht nitrifikationshemmend
10 – 20 % Hemmung	Probe potentiell nitrifikationshemmend
20 – 80 % Hemmung	Probe nitrifikationshemmend
> 80 % Hemmung	Probe verdünnen und noch einmal testen

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

Entsorgung:
Die Polystyrol-Box mit den leeren Vierkantflaschen und Rundküvetten 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.

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

PD 14122 / A012761 / 970001 / 1240.3

Auswertebogen BioFix® Nitrifikationshemmtest *A-Tox*

de

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

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

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

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

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

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

MACHEREY-NAGEL

REF 970001 12.24

BioFix® Nitrification Inhibition Test *A-Tox*

en

Method:
Amperometric method of determining the specific inhibition effect of the substances contained in a sample on ammonia oxidation in connection with microbial nitrification with the aid of defined bacterial strains, preferably of the genus *Nitrosomonas*. The results are specified as % inhibition 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 containing 100 mL *A-Tox* R1
1 test tube containing 2 mL *A-Tox* R2
1 bottle containing 5 mL *A-Tox* R3
1 bottle containing 100 mL *A-Tox* R4

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:
The BioFix® Nitrification Inhibition Test *A-Tox* is to be stored in a refrigerator > 6 °C. **Do not freeze!** Note the printed use-by date.
When carrying out several tests, always place the *A-Tox* R2 reagent in interim storage in the refrigerator.

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

1. 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 (REF 91652), oxygen measuring device, magnetic stirrer, stand with clamps, piston pipettes with tips.
2. For optimum testing, the **oxygen content of the sample** or the sample dilution should be **> 8.0 mg/L O_2**. If necessary, enrich with oxygen before testing by briefly aerating or vigorously shaking the sample (dilution).
3. 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
4. **Homogenise reagent *A-Tox* R2 in the course of the day prior to the planned test by shaking 4 to 6 times (but continuing to store the reagent in the refrigerator > 6 °C)!**
5. 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.
6. Shake reagents R1 and R4 briefly before use!
7. **Reagent *A-Tox* R2 should only be removed from the refrigerator directly before use, and should be returned to the refrigerator immediately after use.** When carrying out several tests, it should be stored in the refrigerator in between tests.
8. Reagents **R2 and R3** are to be drawn up using the microlitre syringe **without air bubbles**!
9. It is essential that the microlitre syringe be rinsed after **each** pipetting operation by drawing up distilled water several times!
10. 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.
11. 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 → …

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: Reactivation of ammonia-oxidizing bacteria (Reagent *A-Tox* R2)

For reasons relating to the reactivation of the *A-Tox* R2 reagent, it is recommended always to carry out the BioFix® *A-Tox* Nitrification Inhibition Test on the afternoon of a working day!

For optimum testing, reagent *A-Tox* R2 should be pretreated as follows:

One day before testing: Reactivate and homogenise reagent *A-Tox* R2 by shaking briefly (e. g. 15 s on Vortex Reagent glass shaker) four to six times during the day (but continue to store the reagent in the refrigerator > 6 °C!).

On the day of testing: Starting around 3 hours prior to beginning testing, reactivate and homogenise reagent *A-Tox* R2 several times (optimal: 30 min cycle) by shaking briefly (e. g. 15 s on Vortex Reagent glass shaker), up to the time of starting the testing (but continue to store the reagent in the refrigerator)!

Note: The activity of reagent A-Tox R2 (can be measured as oxygen consumption in the control over 10 min) very much depends on the degree of the reactivation described. The more intensive the preparation of reagent A-Tox R2, the more active the bacteria and therefore higher the oxygen consumption in the control. Irrespective of this, however, the bacteria in reagent A-Tox R2 naturally lose some activity with increased age. This does not have any influence on the measurement result of the test in % inhibition, however, since the relationship between possible inhibition of the sample in comparison to the oxygen consumption in the control always remains constant even with increased bacteria activity.

Step 2: Control

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

* 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

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

Step 4: Oxygen self-consumption of the sample

*Note: For **not** oxygen self-consuming samples, step 4 can be skipped. While evaluating the test results and calculating the nitrification inhibition, the variable **$\Delta O_{SC-S} = 0$** is used!*

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

   Important: No reagent *A-Tox* R2 is added!
5. **After 2 min** (and before adding reagent *A-Tox* R3!), **read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{SC-S0} (O_2 concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 0 min).
6. Now **add 100 µL of reagent *A-Tox* R3 immediately** via the small injection hole of the electrode adapter, using a microlitre syringe.
7. **After 10 min, read** and record the **oxygen concentration** in the sample preparation O_{SC-S10} (O_2 concentration of sample preparation for determination of oxygen self-consumption at time t = 10 min).

* 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 5: Nitrification inhibition of the sample

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

* 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 6: Evaluation

(1) Oxygen consumption in the control: $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$
(2) Oxygen self-consumption of the sample: $\Delta O_{SC-S} = O_{SC-S0} - O_{SC-S10}$
(3) Oxygen consumption in sample preparation for determination of nitrification inhibition: $\Delta O_{NH-S} = O_{NI-S0} - O_{NI-S10}$
* ΔO_{SC-S} = if there is no oxygen self-consumption of the sample

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

Final result: % inhibition of ammonia 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.

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

< 10 % inhibition (even negative values)	Sample does not inhibit nitrification
10 – 20 % inhibition	Sample may inhibit nitrification
20 – 80 % inhibition	Sample does inhibit nitrification
> 80 % inhibition	Dilute sample and test again

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

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.

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

PD 14122 / A012761 / 970001 / 1240.3

Evaluation sheet BioFix® Nitrification Inhibition Test *A-Tox*

en

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MACHEREY-NAGEL

REF 970001 **12.24** fr

BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *A-Tox*

Méthode :
Méthode ampérométrique pour la détermination de l'action inhibitrice particulière des substances d'échantillonnage quant l'oxydation ammoniacale dans le cadre de la nitrification microbienne à l'aide de groupes de bactéries définis, de préférence appartenant à la catégorie *Nitrosomonas*. 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 avec 100 mL de *A-Tox* R1
1 cuvette ronde avec 2 mL de *A-Tox* R2
1 flacon avec 5 mL de *A-Tox* R3
1 flacon avec 100 mL de *A-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 *A-Tox* doit être conservé dans un réfrigérateur à des températures > 6 °C**. Ne pas congeler !** La date de limite de conservation imprimée doit être respectée. **Entreposer toujours le réactif *A-Tox* R2 sous forme intermédiaire dans un réfrigérateur lors de l'accomplissement de plusieurs tests.**

Veuillez lire et suivre impérativement les indications suivantes avant d'accomplir un test !

1. 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 (REF 91652), appareil de mesure d'oxygène, mélangeur magnétique, support avec pinces, pipettes à course de piston avec pointes.
2. La **teneur en oxygène de l'échantillon** ou de la dilution d'échantillonnage devrait s'élever à **> 8,0 mg/L O_2** pour un accomplissement optimal du test. Le cas échéant, enrichir en oxygène par une brève aération ou en agitant vigoureusement la dilution d'échantillonnage/le prélèvement.
3. 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 de mélange constant. Vitesse de mélange optimale : de 200 à 400 rpm.
4. **Homogénéifier le réactif R2 déjà au cours de la journée avant l'accomplissement du test prévu 4 à 6 fois en l'agitant (le conserver toutefois encore dans un réfrigérateur > 6 °C) !**
5. 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.
6. Bien secouer les réactifs R1 et R4 avant l'utilisation !
7. **Enlever le réactif R2 du compartiment réfrigérant seulement juste avant l'utilisation et ensuite remettre immédiatement au frais.** Lors de l'accomplissement de plusieurs tests, stocker également dans un réfrigérateur.
8. L'absorption des réactifs **R2 et R3** doit avoir lieu à l'aide de la seringue à microfiltre **sous forme exempte de bulles d'air** !
9. Rincer impérativement la seringue à micro-filtre après **chaque** opération de pipetage par absorption d'eau distillée à plusieurs reprises !
10. 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.
11. 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 (étape de travail 2) et la mesure véritable de l'inhibition de la nitrification de l'échantillon ou de l'échantillon dilué (étape de travail 5), une détermination de la demande en oxygène de l'échantillon ou de l'échantillon dilué (étape de travail 4), qui est incluse au calcul du résultat final.*

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

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

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

Etape de travail 1 : Réactivation des bactéries oxydante à l'ammoniaque (Réactif *A-Tox* R2)

Pour des raisons de réactivation du réactif *A-Tox* R2, il est recommandé de réaliser toujours le test de nitrification *A-Tox* BioFix® l'après-midi d'un jour de travail !

En vue d'une réalisation optimale du test, le réactif *A-Tox* R2 doit être traité au préalable comme suit :

Un jour avant la réalisation du test : Dans le courant de la journée, réactiver le réactif *A-Tox* R2 de quatre à la six fois en le secouant brièvement (par ex. 15 s sur l'agitateur de verre à réactif Vortex) et l'homogénéiser (conserver cependant encore au réfrigérateur (> 6 °C) !)

Au jour de la réalisation du test : En commençant env. 3 heures avant le début d'un test jusqu'au début du test, réactiver le réactif *A-Tox* R2 plusieurs fois (l'idéal est un rythme d'environ 30 min) en le secouant brièvement (par ex. 15 s sur l'agitateur de verre à réactif Vortex) et l'homogénéiser (conserver cependant encore au réfrigérateur !).

Indication : L'activité du réactif A-Tox R2 (mesurable comme consommation d'oxygène dans la solution de contrôle pendant plus de 10 min) dépend très fortement de l'étendue de la réactivation décrite. Plus la préparation du réactif A-Tox R2 est intensive, plus les bactéries seront actives et plus la demande en oxygène de la solution de contrôle sera élevée. Indépendamment de cela, les bactéries, avec un âge avancé, perdent cependant naturellement un peu d'activité dans le réactif A-Tox R2. Cela n'a cependant aucune influence 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

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

* Pour des indictions précises sur l'introduction de l'adaptateur pour électrodes à l'électrode pour oxygène, veuillez consulter la fiche jointe explicative du " Starter set pour BioFix® Tests d'Inhibiteurs de Nitrification " (REF 970101).

Etape de travail 3 : Préparation de l'échantillonnage

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

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

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

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

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

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

* Pour des indictions précises sur l'introduction de l'adaptateur pour électrodes à l'électrode pour oxygène, veuillez consulter la fiche jointe explicative du " Starter set pour BioFix® Tests d'Inhibiteurs de Nitrification " (REF 970101).

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

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

* Pour des indictions précises sur l'introduction de l'adaptateur pour électrodes à l'électrode pour oxygène, veuillez consulter la fiche jointe explicative du " Starter set pour BioFix® Tests Inhibiteurs de Nitrification " (REF 970101).

Etape de travail 6 : Evaluation

(1) Consommation d'oxygène de dans la préparation de contrôle : $\Delta O_C = O_{C0} - O_{C10}$
(2) Demande d'oxygène de l'échantillon : $\Delta O_{DE} = O_{DE0} - O_{DE10}$
(3) Consommation d'oxygène de dans la préparation d'inhibition de nitrification de l'échantillon : $\Delta O_{IN-E} = O_{IN-E0} - O_{IN-E10}$
* $\Delta O_{DE} = 0$, en cas d'absence de demande en O_2 de l'échantillon

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

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

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

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

< 10 % d'inhibition (aussi les valeurs négatives)	échantillon sans inhibition de nitrification
10 – 20 % d'inhibition	échantillon avec inhibition de nitrification potentielle
20 – 80 % d'inhibition	échantillon avec inhibition de nitrification
> 80 % d'inhibition	diluer l'échantillon et recommencer le test

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

Elimination des déchets :
La boîte en polystyrène avec les flacons carrés et les cuvettes rondes vides peut être sans problème éliminée parle biais 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 · Valencienner Str. 11 · 52355 Düren · Allemagne
Tél. : +49 24 21 969-0 · info@mn-net.com · ***www.mn-net.com***
France : MACHEREY-NAGEL SAS · 1, rue Gutenberg – BP135 · 67720 Hoerdt · France
Tél. : 03 88 68 22 68 · sales-fr@mn-net.com
MACHEREY-NAGEL SAS (Société par Actions Simplifiée) au capital de 186600 €
Siret 379 859 531 00020 · RCS Strasbourg B379859531 · N° intracommunautaire FR04 379 859 531
PD 14122 / A012761 / 970001 / 1240.3

Formulaire d'évaluation pour BioFix® Test d'Inhibition de Nitrification *A-Tox* fr

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

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

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

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

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

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

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

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

O_{NH-P0} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation d'inhibition de nitrtification de l'échantillon au moment t_0 au commencement de l'essai

O_{NH-P10} : Concentration en oxygène [mg/L] de la préparation d'inhibition de nitrtification de l'échantillon d'après t = 10 min d'incubation

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

MACHEREY-NAGEL

REF 970001 **12.24** es

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

Método:
Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibidor específico de productos contenidos en pruebas procedentes de la oxidación amoniacal en el marco de la nitrificación microbiana con la ayuda de cepas bacterianas definidas, preferentemente de la especia *Nitrosomonas*. Los datos del resultado se hace como % de inhibición del consumo de oxígeno en la solución de prueba en comparación a la de un control no inhibido.

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 con 100 mL *A-Tox* R1
1 cubeta redonda con 2 mL *A-Tox* R2
1 botella con 5 mL *A-Tox* R3
1 botella con 100 mL *A-Tox* R4

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 la personas ni para los animales vertebrados.

Almacenamiento:
Guarde en frigorífico el kit BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación la *A-Tox* **> 6 °C. ¡No congelar!** Tenga en cuenta la fecha de caducidad impresa. **El reactivo *A-Tox* R2, incluso con la realización de varias pruebas, guardelo entre medias en el frigorífico.**

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

1. 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 (REF 91652), medidor de oxígeno, agitador magnético, soporte con fijaciones, pipetas de pistón aspirante con puntas.
2. 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 O_2**. En caso necesario previamente enriquezca la prueba (sin diluir) ventilando brevemente o por agitación fuerte.
3. ¡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.
4. **¡El reactivo R2 prepárelo antes de efectuar la prueba agitándolo 4 a 6 veces para homogenizarlos (sin embargo guárdelo en el frigorífico > 6 °C)!**
5. ¡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.
6. ¡Los reactivos R1 y R4 agítelos antes de usarlos!
7. **El reactivo R2 sáquelo del congelador inmediatamente antes de su uso y después vuelva a guardarlo en el frigorífico.** Incluso con la realización de varias pruebas entre medias vuelva a guardarlo en el frigorífico.
8. ¡La extracción de los reactivos **R2 y R3** con la ayuda de la jeringa de microlitro debe hacerse **libre de burbujas!**
9. ¡Lave necesariamente las jeringas de microlitro después de **cada** pipeteado aspirando varias veces agua destilada!
10. 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.
11. 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 → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → …

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

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

Paso de trabajo 1: Reactivación de bacterias oxidantes amoniacales (Reactivo *A-Tox* R2)

¡Por motivos de reactivación del reactivo *A-Tox* R2 se recomienda efectuar el test de inhibición de la nitrificación BioFix® *A-Tox* siempre en la tarde de un día de trabajo!

Para la mejor realización de la prueba deberá tratarse el reactivo *A-Tox* R2 de la forma siguiente:

Un día antes de efectuar la prueba: Reactive y homogeneice el reactivo *A-Tox* R2 de 4 a 6 veces por día, agitándolo brevemente (p. ex., utilizando agitador de tubo Vortex, para 15 s). ¡Continúe almacenando el reactivo en el frigorífico (> 6 °C)!

El día de efectuar la prueba: Durante las últimas 3 horas antes del inicio de los análisis, reactive y homogeneice el reactivo *A-Tox* R2 varias veces (intervalo ideal: 30 min), agitándolo brevemente (p. ej., utilizando agitador de tubo Vortex, para 15 s). ¡Continúe almacenando el reactivo en el frigorífico!

Nota: La actividad del reactivo A-Tox R2 (corresponde al consumo de oxígeno en la solución control después de 10 min) depende fuertemente de la intensidad de la reactivación descrita. Cuanto más intenso el preparado del A-Tox R2, más activas quedarán las bacterias y más alta será la tasa de consumo de oxígeno en la solución control. En función del envejecimiento, las bacterias no reactivas pierden continuamente un poco de su actividad. Este proceso, puede, no influir de forma alguna en la determinación de la inhibición en por ciento, en vista que la relación entre la posible inhibición de la prueba y el consumo de oxígeno continua igual, a pesar de la disminución de la actividad bacteriana.

Paso de trabajo 2: Control

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

* Las instrucciones exactas para el enchufe del adaptador de electrodos en el electrodo de oxigeno lo encontrará en el prospecto acompañante del "Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación" (REF 970101).

Paso de trabajo 3: Preparaciones para la prueba

1. En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa con la ayuda de los filtro (plegables) comerciales normales, por centrifugación y métodos similares.
2. Ajuste el valor del pH de la prueba con la ayuda de 0,1 N NaOH ó 0,1 N HCl al **pH 7,8 ± 0,2**.
3. **Microfiltre 20 mL de la prueba** utilizando CHROMAFIL® filtros desechables (REF 91652), para apartar la mayor parte de la microflora natural ya existente que puede conducir a resultados falsos.
4. Adicione a un recipiente apropiado (p. ej., un recipiente químico de tamaño suficiente)
   16 mL de la prueba microfiltrada y
   4 mL del reactivo *A-Tox* R4.
5. Mezcle la prueba y agítela bien por 30 s.
   Enseguida, utilice esta solución como **solución prueba** para la determinación de la tasa de consumo de oxígeno (Paso de trabajo 4) y de la inhibición a la nitrificación (Paso de trabajo 5).

Paso de trabajo 4 : Consumo de oxígeno de la prueba

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

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

* 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 5: Inhibición a la nitrificación de la prueba

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

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

Resultado: % de inhibición de la oxidación amoniacal = [(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.

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

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

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

Eliminación:
La caja de poliestireno 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.

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

PD 14122 / A012761 / 970001 / 1240.3

Hoja de valoración BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación *A-Tox*

es

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

Control (Paso de trabajo 2)			Medida de prueba									Resultado
			Denominación de la prueba	Consumo de oxígeno de la prueba (Paso de trabajo 4)			Inhibición de la nitrificación (Paso de trabajo 5)			Consumo de O_2 corregido		
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_C [mg/L] = O_{C0} - O_{C10}		O_{CO-P0} [mg/L]	O_{CO-P10} [mg/L]	ΔO_{CO-P} [mg/L] = O_{CO-P0} - O_{CO-P0}	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}		Inhibición [%] = [(ΔO_C - ΔO_P) : ΔO_C] x 100

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

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

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

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

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

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

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

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

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

MACHEREY-NAGEL