

APLICACIÓN ESPECIAL 05.14 es

REF 970 001 / 970 002

Screeningtest BioFix® A/N-Tox

Método:

Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibidor general de productos contenidos en pruebas procedentes de la nitrificación microbiana por aplicación simultánea de cepas bacterianas oxidantes de amoníaco y nitritos. La prueba no permite ninguna afirmación diferenciada de si se inhibió especialmente el nivel de oxidación amoniacal o por nitritos. Los datos del resultado se hace como % de inhibición del consumo de oxígeno en la solución de prueba en comparación a la de un control no inhibido. Para la realización de la prueba se necesitarán los juegos de reactivos „BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación A-Tox“ (REF 970 001) y „BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación N-Tox“ (REF 970 002).

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

Procedimiento:

Accesorios requeridos: BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación A-Tox (REF 970 001), BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación N-Tox (REF 970 002), Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación (REF 970 101), CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de abertura de 0,45 µm (REF 916 52), medidor de oxígeno, agitador magnético, soporte con fijaciones, pipetas de pistón aspirante con puntas

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

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

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

Procedimiento recomendado con la determinación de la tasa de consumo de oxígeno de la prueba:

C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → CO-P → IN-P → C → 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 → C → IN-P → C → IN-P → IN-P → C →

C = medición de control (Paso de trabajo 2)

CO-P = consumo de oxígeno de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 4)

IN-P = inhibición a la nitrificación de la prueba o de la prueba diluida (Paso de trabajo 5)

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

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

Paso de trabajo 2: Control

- 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 A-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 A-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 libre de 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!
- 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 reactivado del frigorífico o congelador A-Tox R2 y N-Tox R2 y homogeneice por agitación breve. A continuación añada **100 µL de reactivo A-Tox R2 y 100 µL de reactivo N-Tox R2** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo ambos reactivos en frigorífico (A-Tox R2) o en congelador (N-Tox R2).
- Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de control O_{co} (concentración de O₂ del preparado de control en el momento t = 0 min).
¡Importante: ¡Durante los 2 min y antes de que pueda extraerse con la pipeta los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3 lave bien la jeringa de microlitro aspirando varias veces en agua destilada!
- A continuación **adición inmediata de 100 µL de reactivo A-Tox R3 y 100 µL de reactivo N-Tox R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
- Lea después de 10 min** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de control O_{co} (Concentración de O₂ del preparado de control en el momento = 10 min).

Paso de trabajo 3: Preparaciones para la prueba

- En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa **no estéril** con la ayuda de los filtro (plegables) comerciales normales, por centrifugación y métodos similares.
- 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**.
- Microfilitre 20 mL de la prueba** utilizando CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de las aberturas de 0,45 µm (REF 916 52), para apartar la mayor parte de la microflora 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 A-Tox R4.*****
- 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 $\Delta O_{CO-P} = 0!$

- 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 electrodo 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!
- Entretanto, moje toda la superficie del adaptador y, especialmente, los dos huecos, con agua destilada (p. ej., utilizando un frasco de lavado), impidiendo el contacto con aire.
Importante: ¡No adición de los reactivos A-Tox R2 y N-Tox R2!
- Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de la prueba O_{co-P0} (Concentración de 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 A-Tox R3 y 100 µL de reactivo N-Tox R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
- Lea después de 10 min** 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 adaptador del electrodo 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!
- 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 reactivado del frigorífico o congelador A-Tox R2 y N-Tox R2 y homogeneice por agitación breve. A continuación añada **100 µL de reactivo A-Tox R2 y 100 µL de reactivo N-Tox R2** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo ambos reactivos en frigorífico (A-Tox R2) o en congelador (N-Tox R2).
- Haga la lectura después de 2 min** (¡antes de la adición de los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3!) y anote la **concentración de oxígeno** en el preparado de control O_{in-P0} (concentración de O₂ del preparado de control en el momento t = 0 min).
¡Importante: ¡Durante los 2 min y antes de que pueda extraerse con la pipeta los reactivos A-Tox R3 y N-Tox R3 lave bien la jeringa de microlitro aspirando varias veces en agua destilada!
- A continuación **adición inmediata de 100 µL de reactivo A-Tox R3 y 100 µL de reactivo N-Tox R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
- Lea después de 10 min** y anote la **concentración de oxígeno** con el preparado de control O_{in-P10} (Concentración de O₂ del preparado de control en el momento = 10 min).

Paso de trabajo 6: Valoración

- Consumo de oxígeno en el preparado de control: $\Delta O_c = O_{CO} - O_{C10}$
 - Consumo de oxígeno de la prueba: $\Delta O_{CO-P} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$
 - 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: $\Delta O_p = \Delta O_{IN-P} \cdot \Delta O_{CO-P}$

Resultado:

% de inhibición de la nitrificación total = $[(\Delta O_c - \Delta O_p) : \Delta O_c] \times 100$

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

* Las instrucciones exactas para el enchufe del adaptador de electrodos en el electrodo de oxígeno lo encontrará en el prospecto acompañante del „Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación“ (REF 970 101).

** Como alternativa, también se puede utilizar el reactivo N-Tox R1.

*** Como alternativa, también se puede utilizar el reactivo N-Tox R4.

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+1, y una inhibición de 15 % en la prueba diluida a 1+3, sería el valor $G_{IN} = 4$.

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)			
O_{C0} [mg/L]	O_{C10} [mg/L]	ΔO_c [mg/L] = $O_{C0} - O_{C10}$		O_{CO-P0} [mg/L]	O_{CO-P10} [mg/L]	ΔO_{CO-P} [mg/L] = $O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$	O_{IN-P0} [mg/L]	O_{IN-P10} [mg/L]	ΔO_{IN-P} [mg/L] = $O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$	ΔO_p [mg/L] = $\Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$

O_{C0} : Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado de control en el momento t_0 al inicio del ensayo
 O_{C10} : Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado de control después de $t = 10$ min de incubación
 ΔO_c : Consumo de oxígeno [mg/L] en preparado de control después de $t = 10$ min de incubación
 O_{CO-P0} : Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t_0 al inicio del ensayo
 O_{CO-P10} : Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba después de $t = 10$ min de incubación
 ΔO_{CO-P} : Consumo de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba después de $t = 10$ min de incubación
 O_{IN-P0} : Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t_0 al inicio del ensayo
 O_{IN-P10} : Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación después de $t = 10$ min de incubación
 ΔO_{IN-P} : Consumo de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación después de $t = 10$ min de incubación