

Método: Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibidor específico de productos contenidos en pruebas pertenecientes de la oxidación amoniacal en el marco de la nitrificación microbiana con la ayuda de cepas bacterianas definidas, preferentemente de la especie *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 5 mL A-Tox R3
 1 botella con 100 mL A-Tox R1 1 botella con 100 mL A-Tox R4
 1 cubeta redonda con 2 mL A-Tox 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 la personas ni para los animales vertebrados.

Almacenamiento:
 Guarde en frigorífico el kit BioFix[®] Test de Inhibición de la Nitrificación la A-Tox para 2–8 °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!**
- Los siguientes accesorios serán necesarios para efectuar una correcta prueba: Juego inicial para BioFix[®] Test de Inhibición de la Nitrificación (REF 970 101), CHROMAFIL[®] filtros desechables (REF 916 52), 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.
 - ¡**El reactivo R2 prepárelo antes de efectuar la prueba agitando 4 a 6 veces para homogenizarlos (sin embargo guárdelo en el frigorífico)!**
 - Los reactivos **R1, R3 y R4** péngalos 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 ágilelos antes de usarlos!
 - 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.
 - 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 – 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 – 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: Reactivo 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!
El día de efectuar la prueba: Durante las últimas 3 horas antes del inicio de los análisis, reactivo 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 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 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).
- 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 ágiteo 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 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 frigorífico.
- 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 control O_{CO-P} (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 el reactivo A-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** 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-P} (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 970 101).

Paso de trabajo 3: Preparaciones para la prueba

- En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa 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 (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 ágiteela 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 **ágiteo** 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 A-Tox R2!
- 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-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 A-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_{IN-P} (Concentración de O₂ 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 970 101).

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 **ágiteo** 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 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 frigorífico.
- 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-P} (Concentración de O₂ 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!***
- 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.
- Lea después de 10 min** 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).

* 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).

Paso de trabajo 6: Valoración
 (1) Consumo de oxígeno en el preparado de control: **ΔO_c** = O_{CO} – O_{CO10}
 (2) Consumo de oxígeno de la prueba: **ΔO_{DE}** = O_{CO-P} – O_{CO-P10}
 (3) Consumo de oxígeno en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en la prueba: **ΔO_{IN-P}** = O_{IN-P0} – 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:

$$\Delta O_p = \Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$$

Resultado:
% de inhibición de la oxidación amoniacal = $[(\Delta O_c - \Delta O_p) : \Delta O_c] \times 100$
Para la valoración recomendamos la utilización de la hoja de valoración acompañante en el dorso de estas instrucciones de uso. Esta puede copiarse para su propio uso.

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

< 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_N**, 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_N = 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 sustancias 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.

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

Control (Paso de trabajo 2)			Denominación de la prueba	Medida de prueba				Resultado Inhibición [%] = [(ΔO _c - ΔO _p) : ΔO _c] x 100		
				Consumo de oxígeno de la prueba (Paso de trabajo 4)		Inhibición de la nitrificación (Paso de trabajo 5)			Consumo de O ₂ corregido	
O _{CO} [mg/L]	O _{CO10} [mg/L]	ΔO _c [mg/L] = O _{CO} - O _{CO10}		O _{CO-P} [mg/L]	O _{CO-P10} [mg/L]	ΔO _{CO-P} [mg/L] = O _{CO-P} - O _{CO-P10}	O _{IN-P0} [mg/L]		O _{IN-P10} [mg/L]	ΔO _{IN-P} [mg/L] = O _{IN-P0} - O _{IN-P10}

O_{CO}: Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado control en el momento t₀ al inicio del ensayo

O_{CO-P}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t₀ al inicio del ensayo

O_{IN-P0}: Concentración de oxígeno [mg/L] en la solución para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t₀ al inicio del ensayo

O_{CO10}: Concentración de oxígeno [mg/L] en preparado control en el momento t = 10 min de incubación

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

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_c: Consumo de oxígeno [mg/L] en preparado de control 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

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

