

Art.-Nº 970 002

01.05



BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación N-Tox

Método:

Procedimiento amperimétrico para la determinación del efecto inhibitor específico de productos contenidos en pruebas procedentes de la nitrificación oxidativa en el marco de la nitrificación microbiana con la ayuda de cepas bacterianas definidas, preferentemente de la especie *Nitrobacter*. Los datos del resultado se hace como % de inhibición del consumo de oxígeno en la solución de prueba en comparación a la de un control no 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, blanca con 5 ml <i>N-Tox</i> R3
1 botella, color natural con 100 ml <i>N-Tox</i> R1	1 botella, negra con 100 ml <i>N-Tox</i> R4
1 cubeta redonda con 2 ml <i>N-Tox</i> R2	

Precauciones de seguridad:

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

Almacenamiento:

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

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

- Los siguientes accesorios serán necesarios para efectuar una correcta prueba: Juego inicial para BioFix® Test de Inhibición de la Nitrificación (Art.-Nº 970 001), CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de abertura de 0,45 µm (Art.-Nº 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.
- Los reactivos R1, R3 y R4 póngalos a la temperatura ambiental antes de efectuar la prueba! Esto se hace favorablemente sacando estos reactivos ya el día anterior al del análisis fuera del frigorífico.
- ¡Los reactivos R1 y R4 agítelos antes de usarlos!
- Retire el reactivo R2 inmediatamente antes del uso, descongélelo completamente y después, almacénelo en el congelador de nuevo.** Entre varios tests consecutivos, también coloque el reactivo en el congelador.
- ¡La extracción de los reactivos R2 y R3 con la ayuda de la jeringa de microlitro debe hacerse libre de burbujas!
- ¡Lave necesariamente las jeringas de microlitro después de cada pipeteado aspirando varias veces agua destilada!
- El adaptador de electrodos, el recipiente de reacción y los electrodos de oxígeno lávelos con agua destilada después de cada medida para evitar contaminaciones externas al medir la prueba siguiente.
- Los recipientes contenidos en el juego de prueba son recipientes de varios usos y pueden utilizarse de nuevo después de lavarlos con agua destilada.

Procedimiento:

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

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

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

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

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

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

C = medición de control (Paso de trabajo 2)

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

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

Paso de trabajo 1: Preparación de bacterias oxidantes nitrificantes (Reactivo N-Tox R2)

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

Observación: En función del envejecimiento, las bacterias no reactivan pierden continuamente un poco de su actividad. Este proceso, sin embargo, no influye de forma alguna en la determinación de la inhibición en por ciento, ya que la relación entre la posible inhibición

Paso de trabajo 2: Control

- Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O₂*. Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
- Agite fuertemente el reactivo N-Tox R1** para el enriquecimiento de oxígeno durante 30 s y a continuación llene el recipiente de reacción hasta su rebosa **libre de burbujas** con el **reactivo N-Tox R1** (aprox. 7 - 8 ml).
- Introduzca el electrodo O₂ con el adaptador del electrodo enchufado y con cuidado en el recipiente de reacción hasta que quede cubierto hermético al aire y sin burbujas (el medio sobrante rebosa). Este preparado **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 del congelador *N-Tox* R2 descongélelo **completamente** y homogeneice agitándolos brevemente. A continuación añada 100 µl de reactivo *N-Tox* R2 por medio de el pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo el reactivo *N-Tox* R2 en el congelador.
- Haga la lectura después de 2 minutos (¡ antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3 !) y anote la concentración de oxígeno en el preparado de control O_{CO-P} (concentración de O₂ en la solución de control en el momento t = 0 min.).
¡Importante: Durante los 2 minutos y antes de que pueda extraerse con la pipeta el reactivo N-Tox R3 lave bien la jeringa de microlitro aspirando varias veces en agua destilada!
- A continuación adición inmediata de 100 µl de reactivo *N-Tox* R3 a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
- Lea después de 10 minutos** y anote la concentración de oxígeno con el preparado de control O_{IN-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“ (Art. No 970 01).

Paso de trabajo 3: Preparación de prueba	
1.	En las pruebas muy turbias efectúe primeramente una filtración previa <u>no estéril</u> 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 NaOH ó 0,1 NHCl al pH 7,8 ± 0,2 .
3.	Microfiltrate 20 ml de la prueba utilizando CHROMAFIL® filtros desechables, no estériles, tamaño de las aberturas de 0,45 µm (Art.-Nº 916 52), para apartar la mayor parte de la microflora natural ya existente que puede conducir a resultados falsos.
4.	Añadición a un recipiente apropiado (p. ej., un recipiente químico de tamaño suficiente) 16 ml de la prueba microfiltrada y 4 ml del reactivo N-Tox R4.
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 $\Delta O_{CO-P} = 0!$

- 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 **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 del reactivo N-Tox R2 !**
- Haga la lectura después de 2 minutos (¡ antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3 !) y anote la concentración de oxígeno en el preparado de la prueba O_{CO-P} (Concentración de O₂ en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t = 0 min).
 - A continuación adición **inmediata de 100 µl de reactivo N-Tox R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
 - Lea después de 10 minutos** y anote la concentración de oxígeno con el preparado de la prueba O_{CO-P10} (Concentración de O₂ en la solución para la determinación del consumo de oxígeno de la prueba en el momento t = 10 min).

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

- Enchufe el adaptador de electrodos al electrodo O₂*. Ponga la pieza agitadora en el recipiente de reacción y colóquelo en el agitador magnético.
- llene el recipiente de reacción con la **solución prueba (pH 7,8)** del paso de trabajo 3 (aprox. 7 - 8 ml), **sin la formación de burbujas de aire.**
- Introduzca el electrodo O₂ con el adaptador del electrodo enchufado y con cuidado en el recipiente de reacción hasta que quede cubierto hermético al aire y sin burbujas (el medio sobrante rebosa). Este preparado **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 del congelador *N-Tox* R2 descongélelo completamente y homogeneice agitándolos brevemente. A continuación añada 100 µl de reactivo *N-Tox* R2 por medio de el pequeño taladro de inyección del adaptador de electrodos con la ayuda de una jeringa de microlitros. A continuación guarde de nuevo el reactivo *N-Tox* R2 en el congelador.
- Haga la lectura después de 2 minutos** (¡ antes de la adición del reactivo *N-Tox* R3 !) y anote la concentración de oxígeno en el preparado de la prueba O_{IN-P0} (Concentración de O₂ en la solución prueba para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t = 0 min).
- A continuación adición **inmediata de 100 µl de reactivo N-Tox R3** a través del pequeño taladro de inyección del adaptador del electrodo con la ayuda de una jeringa de microlitro.
- Lea después de 10 minutos** y anote la concentración de oxígeno con el preparado de la prueba O_{IN-P10} (Concentración de O₂ en la solución prueba para determinar la inhibición a la nitrificación en el momento t = 10 min).

Paso de trabajo 6: Valoración

- 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: $\Delta O_P = \Delta O_{IN-P} - \Delta O_{CO-P}$

Resultado:

% de inhibición de la oxidación nitrato = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

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“ (Art. No 970 01).

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 presentaría una inhibición inferior de 20%.

Ejemplo: Si fuera determinada una inhibición de 35% en la prueba diluida a 1:2, y una inhibición de 15% en la prueba diluida a 1:4, sería el valor G_{IN} = 4.

Eliminación:

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

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG · Apto. de correos 101352 · D-52313 Dueren (Alemania)
Teléfono +49 2421 969-0 · Telefax +49 2421 969-199 · E-Mail: sales-de@mn-net.com