

# APPLICAZIONE SPECIALE 05.14 it

## REF 970 001 / 970 002

# Screeningtest BioFix® A/N-Tox

Metodo:

Metodo amperometrico di determinazione del potere d'inibizione generale dei componenti delle prove sulla nitrificazione microbica con impiego simultaneo di ceppi batterici ad azione ossidante sull'ammoniaca e di ceppi batterici ad azione ossidante sul nitrito. Il test non consente una valutazione differenziata, adatta a determinare se viene inibito in particolare lo stadio di ossidazione dell'ammoniaca o in particolare quello del nitrito. I risultati sono espressi in % d'inibizione del consumo di ossigeno nella soluzione di prova a confronto con una soluzione di controllo non inibita. Per l'esecuzione del test sono necessari i corredi di reagenti "BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione A-Tox" (REF 970 001) e "BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione N-Tox" (REF 970 002).

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

Procedimento:

Accessori necessari: BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione A-Tox (REF 970 001), BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione N-Tox (REF 970 002), Starter-Set per i BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione (REF 970 101), CHROMAFIL® Filtro monouso, non sterile, dimensioni dei pori 0,45 µm (REF 916 52), misuratore di ossigeno, agitatore magnetico, stativo con pinze, pipetta a stantuffo con punte.

**Prima di eseguire il test si prega di leggere e rispettare scrupolosamente i fogli illustrativi dei corredi BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione A-Tox e N-Tox!**

Nell'ambito di una serie di misurazioni, si raccomanda di ripetere una nuova rilevazione di controllo ogni due rilevazioni della prova al massimo (determinazione del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa ovvero della sua capacità di inibizione del processo di nitrificazione)

In base al principio sottostante a questo test rapido di rilevazione dell'ossigeno, i **prova contenenti sostanze a forte consumo di ossigeno** potrebbero produrre dei falsi risultati di rilevazione e mascherare eventuali effetti con potenziale di inibizione del processo di nitrificazione. Per compensare il forte consumo di ossigeno, oltre a una rilevazione di controllo (2ª fase) e alla misurazione del grado di inibizione del processo di nitrificazione della prova, ovvero la diluizione della prova (5ª fase), è necessario determinare il consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (la diluizione della prova) (4ª fase). Questo dato viene incluso nel calcolo del risultato finale.

Sequenza di rilevazioni raccomandate **con** stima del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:

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

Sequenza di rilevazioni raccomandate **senza** stima del consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:

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

C = rilevazione di controllo (2ª fase)

CO-P = consumo di ossigeno inerente alla prova stessa o diluizione della prova (4ª fase)

IN-P = inibizione del processo di nitrificazione della prova o diluizione della prova (5ª fase)

### 1ª fase: Preparazione dei batteri nitrificanti (Reagenti A-Tox R2 e N-Tox R2)

Preparare i reagenti A-Tox R2 e N-Tox R2 come descritto nei fogli illustrativi dei rispettivi corredi di test. Osservare le disposizioni locali!

### 2ª fase: Controllo

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O<sub>2</sub>.\* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- Agitare energicamente per 30 s il reagente A-Tox R1\*\*** per ossigenarlo e riempire quindi il recipiente di reazione con il **reagente A-Tox R1\*\*** (circa 7–8 mL) fino a farlo traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
- L'elettrodo O<sub>2</sub> completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a **chiuderlo ermeticamente e senza bolle** (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1–2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione. **Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!**
- Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.
- Estrarre dal refrigeratore i reagenti A-Tox R2 e N-Tox R2 già riattivati ed omogeneizzarlo agitando brevemente. Dopodiché **aggiungere 100 µL di reagente A-Tox R2 e 100 µL di reagente N-Tox R2** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi, utilizzando a tale scopo una siringa micrometrica. Reinserrire subito i reagenti in un luogo fresco (A-Tox R2) o nel surgelatore (N-Tox R2).
- Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di controllo O<sub>CO</sub> (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 0 min). **Importante: Durante questi 2 min e prima di pipettare i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3 si deve lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!**
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente A-Tox R3 e 100 µL di reagente N-Tox R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di controllo O<sub>C10</sub> (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 10 min).

### 3ª fase: Preparazione della prova

- In caso di prove particolarmente torbide si deve dapprima eseguire una prefiltrazione **non sterilizzata** con filtri (a pieghe) comunemente reperibili in commercio oppure mediante centrifugazione o metodi simili.
- Regolare il valore di pH della prova sul **pH 7,8 ± 0,2** aggiungendo 0,1 N NaOH oppure 0,1 N HCl.
- Filtrare finemente 20 mL di prova** con CHROMAFIL® Filtri monouso, non sterili, dimensioni dei pori 0,45 µm (REF 916 52) (per eliminare la maggior parte della microflora già presente naturalmente, che può produrre dei falsi risultati).
- Versare in una provetta appropriata (p.es., becher di capacità sufficiente) **16 mL di soluzione di prova filtrata finemente e 4 mL di reagente A-Tox R4.\*\*\***
- Mescolare bene il preparato e agitare in modo energico per 30 s per aumentare la percentuale di ossigeno. Infine, utilizzare come **soluzione di prova** per determinare il consumo di ossigeno inerente alla prova (4ª fase) ovvero il grado di inibizione del processo di nitrificazione (5ª fase).

### 4ª fase: Consumo di ossigeno inerente alla prova

**Nota:** Nel caso di campioni che **non** consumano ossigeno è possibile saltare la 4ª fase. Nell'ambito della valutazione del test e del calcolo della capacità di inibizione del processo di nitrificazione, in questo caso viene considerata la variabile  $\Delta O_{CO-P} = 0!$

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O<sub>2</sub>.\* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- Riempire il recipiente di reazione con la **soluzione di prova, pH 7,8** (circa 7–8 mL) secondo la 3ª fase fino a farla traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
- L'elettrodo O<sub>2</sub> completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a **chiuderlo ermeticamente e senza bolle** (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1–2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione. **Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!**
- Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.

**Importante: Non aggiungere i reagenti A-Tox R2 e N-Tox R2!**

- Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova O<sub>CO-P0</sub> (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min).
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente A-Tox R3 e 100 µL di reagente N-Tox R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di prova O<sub>CO-P10</sub> (concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 10 min).

### 5ª fase: Inibizione del processo di nitrificazione della prova

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O<sub>2</sub>.\* Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- Riempire il recipiente di reazione con la **soluzione di prova, pH 7,8** (circa 7–8 mL) secondo la 3ª fase fino a farla traboccare e **senza includere bolle d'aria**.
- L'elettrodo O<sub>2</sub> completo di adattatore degli elettrodi deve essere quindi inserito nel recipiente di reazione fino a **chiuderlo ermeticamente e senza bolle** (il fluido eccessivo trabocca). **Agitare** questa soluzione per circa **1–2 min** con l'agitatore magnetico fino a rilevare un costante valore di ossigeno sull'apparecchio di misurazione. **Evitare assolutamente la formazione di bolle d'aria!**
- Nel frattempo, umidificare con acqua distillata (p.es., usando una spruzzetta) l'intera superficie dell'adattatore degli elettrodi e in particolare i due fori nella chiusura ermetica.
- Estrarre dal refrigeratore i reagenti A-Tox R2 e N-Tox R2 già riattivati ed omogeneizzarlo agitando brevemente. Dopodiché **aggiungere 100 µL di reagente A-Tox R2 e 100 µL di reagente N-Tox R2** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi, utilizzando a tale scopo una siringa micrometrica. Reinserrire subito i reagenti in un luogo fresco (A-Tox R2) o nel surgelatore (N-Tox R2).
- Rilevare il risultato dopo 2 min** (e prima di aggiungere i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3) ed annotare il **tenore d'ossigeno** nella soluzione di prova O<sub>IN-P0</sub> (concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min). **Importante: Durante questi 2 min e prima di pipettare i reagenti A-Tox R3 e N-Tox R3 si deve lavare accuratamente la siringa micrometrica caricandola più volte con acqua distillata!**
- Aggiungere **tempestivamente** con la micropipetta **100 µL di reagente A-Tox R3 e 100 µL di reagente N-Tox R3** attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 min** ed annotare il **tenore d'ossigeno** della soluzione di prova O<sub>IN-P10</sub> (Concentrazione di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova nel momento t = 10 min).

### 6ª fase: Valutazione

- Consumo di ossigeno nella soluzione di controllo:  $\Delta O_C = O_{CO} - O_{C10}$
- Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:  $\Delta O_{CO-P} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$
- Consumo di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova:  $\Delta O_{IN-P} = O_{IN-P0} - O_{IN-P10}$

\*  $\Delta O_{CO-P} = 0$ , in caso di assenza del consumo di O<sub>2</sub> inerente alla prova.

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

**Risultato:**

**% di inibizione della nitrificazione =  $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$**

*Si suggerisce l'uso del formulario di valutazione sul retro delle presenti istruzioni. L'utilizzatore può riprodurre a piacere il modulo per il suo uso personale.*

\* Per dettagliate istruzioni relative al montaggio dell'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo dell'ossigeno si prega di consultare il foglio illustrativo del „Starter-Set per i BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione“ (REF 970 101).

\*\* In alternativa può essere impiegato anche il reagente N-Tox R1.

\*\*\* In alternativa può essere impiegato anche il reagente N-Tox R4.

### Interpretazione dei risultati:

I valori ottenuti possono essere così interpretati:

- |                   |                                                                   |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------|
| 0–10% inibizione  | La prova non inibisce il processo di nitrificazione               |
| 10–20% inibizione | La prova può potenzialmente inibire il processo di nitrificazione |
| 20–80% inibizione | La prova inibisce il processo di nitrificazione                   |
| > 80% inibizione  | Diluire la prova e ripetere il test                               |

Come ulteriore possibilità, **non soggetta all'applicazione di particolari norme**, per confrontare e valutare i dati sull'inibizione in vari tempi della prova o tra diversi punti, il risultato può anche essere indicato come **valore G<sub>IN</sub>** in linea con altri test di biossiccità (p.es., test dei batteri luminosi conformemente alla norma DIN EN ISO 11348). Questo valore è considerato il reciproco della prima fase di diluizione della prova dove, per la prima volta, l'inibizione del processo di nitrificazione è inferiore al 20%.

**Esempio:** Se per una diluizione 1+1 della prova si registra un'inibizione del 35% e per un rapporto di 1+3 la percentuale di inibizione è del 15%, il valore  $G_{IN} = 4$ .

Data dell'analisi: \_\_\_\_\_ Nome dell'utilizzatore: \_\_\_\_\_

Controllo (2 <sup>a</sup> fase)			Misurazione della prova							Risultato
			Denominazione della prova	Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (4 <sup>a</sup> fase)			Inibizione della nitrificazione (5 <sup>a</sup> fase)			
O <sub>C0</sub> [mg/L]	O <sub>C10</sub> [mg/L]	ΔO <sub>C</sub> [mg/L] = O <sub>C0</sub> - O <sub>C10</sub>		O <sub>CO-P0</sub> [mg/L]	O <sub>CO-P10</sub> [mg/L]	ΔO <sub>CO-P</sub> [mg/L] = O <sub>CO-P0</sub> - O <sub>CO-P10</sub>	O <sub>IN-P0</sub> [mg/L]	O <sub>IN-P10</sub> [mg/L]	ΔO <sub>IN-P</sub> [mg/L] = O <sub>IN-P0</sub> - O <sub>IN-P10</sub>	ΔO <sub>P</sub> [mg/L] = ΔO <sub>IN-P</sub> - ΔO <sub>CO-P</sub>

O<sub>C0</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo al momento t<sub>0</sub> all'inizio del test  
 O<sub>C10</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo dopo t = 10 min di incubazione  
 ΔO<sub>C</sub>: Consumo di ossigeno [mg/L] nella soluzione di controllo dopo t = 10 min di incubazione

O<sub>CO-P0</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa al momento t<sub>0</sub> all'inizio del test  
 O<sub>CO-P10</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa dopo t = 10 min di incubazione  
 ΔO<sub>CO-P</sub>: Consumo di ossigeno [mg/L] inerente alla prova stessa dopo t = 10 min di incubazione

O<sub>IN-P0</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova al momento t<sub>0</sub> all'inizio del test  
 O<sub>IN-P10</sub>: Concentrazione di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova dopo t = 10 min di incubazione  
 ΔO<sub>IN-P</sub>: Consumo di ossigeno [mg/L] nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova dopo t = 10 min di incubazione