

Cod. art. 970 002

01.05



BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione N-Tox

Metodo:
Metodo amperometrico di determinazione della specifica azione inibitoria dei componenti delle prove sull'ossidazione del nitrito in correlazione con la nitrificazione microbica ottenuta mediante determinati ceppi batterici appartenenti preferibilmente alla specie *Nitrobacter*. I risultati vengono espressi in % d'inibizione del consumo di ossigeno nella soluzione di prova a confronto con una soluzione di controllo non inibita.

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

Contenuto set di reagenti:

5 recipienti di reazione
1 bottiglia, bianca con 100 ml *N-Tox R1*
1 cuvetta rotonda con 2 ml *N-Tox R2*
1 bottiglia, bianca con 5 ml *N-Tox R3*
1 bottiglia, nera con 100 ml *N-Tox R4*

Avvertenze di pericolo:

Questo test di rapida esecuzione non contiene sostanze pericolose soggette ad obbligo di contrassegnatura. I microrganismi nitrificanti utilizzati sono classificati nella scheda descritta B006 1/92 ZH 1/346 della Berufsgenossenschaft der chemischen Industrie (Cassa mutua dell'industria chimica, Germania) come appartenenti alla classe di rischio 1, ovvero secondo le attuali conoscenze scientifiche non comportano alcun rischio per l'uomo e per i vertebrati.

Magazzinaggio:

Il reagente *N-Tox R2* deve essere conservato in frigorifero ad una temperatura compresa tra -20 ± 2 °C. La confezione con gli ulteriori reagenti può anche essere conservata in un luogo fresco, ossia ad una temperatura compresa tra +2 °C e +8 °C. Rispettare la data di scadenza stampata sulla confezione. Il reagente R2 deve essere estratto dal frigorifero soltanto pochi istanti prima di essere utilizzato. Dopodiché deve essere sbrinato ed omogeneizzato. Conservare sempre in frigorifero il reagente, anche durante l'esecuzione di molteplici test.

Si prega di leggere e rispettare scrupolosamente i seguenti avvisi prima di eseguire i test!

- Per una regolare esecuzione dei test sono necessari i seguenti accessori: Starter-Set per i BioFix® Test d'Inibizione della Nitrificazione (Cod. art. 970 101), CHROMAFIL® Filtro monouso, non sterile, dimensioni dei pori 0,45 µm (Cod. art. 916 52), misuratore di ossigeno, agitatore magnetico, stativo con pinze, pipetta a stantuffo con punte.
- Per un'ideale esecuzione dei test è necessario un tenore di ossigeno della prova $> 8,0$ mg/l O₂. Ove necessario, ossigenare la prova mediante una breve ventilazione oppure agitando energicamente (soluzione) prima dell'uso.
- La velocità di miscelazione dell'agitatore magnetico ha un'influenza significativa sul grado di consumo di ossigeno! Pertanto, si raccomanda di effettuare tutte le rilevazioni di una serie alla stessa velocità. Velocità di miscelazione ottimale: 200-400 rpm
- I reagenti R1, R3 e R4 devono essere portati a temperatura ambiente prima dell'esecuzione dei test! Per garantire questa condizione è opportuno estrarre dal frigorifero questi reagenti già un giorno prima dell'analisi.
- Agitare brevemente i reagenti R1 e R4 prima dell'uso!
- Togliere il reagente R2 dal freezer solo immediatamente prima dell'utilizzo, lasciarlo scongelare completamente e infine riporlo nuovamente in freezer. Conservare in freezer anche quando si effettuano diversi test.
- L'aspirazione dei reagenti R2 e R3 con la siringa micrometrica deve avvenire senza inclusioni di bolle d'aria!
- È assolutamente indispensabile lavare la siringa micrometrica dopo ogni pipettaggio caricandola più volte con acqua distillata!
- Dopo ogni processo di misurazione si devono lavare con acqua distillata l'adattatore degli elettrodi, il recipiente di reazione e l'elettrodo dell'ossigeno al fine di prevenire contaminazioni esterne durante la misurazione della successiva prova.
- I recipienti di reazione contenuti nel kit possono essere riutilizzati dopo essere stati lavati con acqua.

Procedimento:

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 (2° fase) e alla misurazione del grado di inibizione del processo di nitrificazione della prova, ovvero la diluizione della prova (5° fase), è necessario determinare il consumo di ossigeno inerente alla prova stessa (la diluizione della prova) (4° 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 → 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 → 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)

1° fase: Preparazione dei batteri ossidanti del nitrito (Reagente N-Tox R2)

Togliere dal freezer il reagente *N-Tox R2* solo immediatamente prima dell'inizio del test, lasciarlo scongelare completamente (!) e omogeneizzare agitando brevemente. Riporre il reagente *N-Tox R2* nuovamente nel freezer dopo averlo aggiunto alla prova!

Importante: Anche a fronte di una conservazione appropriata, l'attività dei batteri contenuti nel reagente *N-Tox R2* diminuisce naturalmente con il passare del tempo. Questo dato non ha alcun impatto sul risultato della rilevazione del test in termini di inibizione percentuale, poiché il rapporto di proporzionalità tra la possibile inibizione della prova rispetto al consumo di ossigeno nel controllo persiste anche in presenza di una riduzione dell'attività dei batteri.

2° fase: Controllo

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O₂. Inserire l'elemento magnetico nel recipiente di reazione e sistemare il recipiente sull'agitatore magnetico.
- Agitare energicamente per 30 s il Reagente *N-Tox R1* per ossigenarlo e riempire quindi il recipiente di reazione con il Reagente *N-Tox R1* (circa 7 - 8 ml) fino a farlo traboccare e senza includere bolle d'aria.
- L'elettrodo O₂ 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.
- Togliere dal freezer il reagente *N-Tox R2*, lasciarlo scongelare completamente e omogeneizzare agitando brevemente. Dopodiché aggiungere 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 il reagente *N-Tox R2* nel freezer.
- Rilevare il risultato dopo 2 minuti (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox R3*!) ed annotare il tenore d'ossigeno nella soluzione di controllo O_{CO} (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 0 min).
Importante: Durante questi 2 minuti e prima di pipettare il Reagente *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 *N-Tox R3* attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti ed annotare il tenore d'ossigeno della soluzione di controllo O_{CO} (Concentrazione di ossigeno della soluzione di controllo nel momento t = 10 min).

* 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“ (Cod. art. 970 101).

3° 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 (Cod. art. 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 *N-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 (4° fase) ovvero il grado di inibizione del processo di nitrificazione (5° fase).

4° 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 O₂. 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 O₂ 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 il reagente N-Tox R2!

- Rilevare il risultato dopo 2 minuti (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox R3*!) ed annotare il tenore d'ossigeno nella soluzione di prova O_{CO-P} (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 0 min).
- Aggiungere tempestivamente con la micropipetta 100 µl di reagente *N-Tox R3* attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti ed annotare il tenore d'ossigeno della soluzione di prova O_{CO-P10} (Concentrazione di ossigeno inerente alla prova stessa nel momento t = 10 min).

5° fase: Inibizione del processo di nitrificazione della prova

- Collegare l'adattatore degli elettrodi sull'elettrodo O₂. 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 O₂ 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.
- Togliere dal freezer il reagente *N-Tox R2*, lasciarlo scongelare completamente e omogeneizzare agitando brevemente. Dopodiché aggiungere 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 il reagente *N-Tox R2* nel freezer.
- Rilevare il risultato dopo 2 minuti (e prima dell'aggiunta del reagente *N-Tox R3*!) ed annotare il tenore d'ossigeno nella soluzione di prova O_{IN-P} (Concentrazione di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova nel momento t = 0 min).
- Aggiungere tempestivamente con la micropipetta 100 µl di Reagente *N-Tox R3* attraverso il piccolo foro d'iniezione dell'adattatore degli elettrodi.
- Rilevare il risultato dopo 10 minuti ed annotare il tenore d'ossigeno della soluzione di prova O_{IN-P10} (Concentrazione di ossigeno nella quota di inibizione del processo di nitrificazione della prova nel momento t = 10 min).

6° fase: Valutazione

(1) Consumo di ossigeno nella soluzione di controllo:

$$\Delta O_C = O_{CO} - O_{CO10}$$

(2) Consumo di ossigeno inerente alla prova stessa:

$$\Delta O_{CO-P} = O_{CO-P0} - O_{CO-P10}$$

(3) 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 O₂ inerente alla prova

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

Risultato:

% di inibizione dell'ossidazione del nitrito = $[(\Delta O_C - \Delta O_P) : \Delta O_C] \times 100$

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“ (Cod. art. 970 101).

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_{IN}, in linea con altri test di tossicità (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 1:2 della prova si registra un'inibizione del 35% e per un rapporto di 1:4 la percentuale di inibizione è del 15%, il valore G_{IN} = 4

Smaltimento:

Il contenitore in polistirolo con le bottiglie rettangolari vuote e le cuvette rotonde può essere facilmente smaltito assieme ai normali rifiuti domestici. Le soluzioni di prova possono essere facilmente versate nello scarico del lavandino. Problemi di smaltimento possono sorgere se la prova contiene sostanze nocive, velenose o richiedenti speciali processi di smaltimento. L'utilizzatore è responsabile per un regolare smaltimento di queste soluzioni in conformità alle vigenti direttive e prescrizioni.

MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG - Casella Postale 10 13 52 - D-52313 Dueren (Germania)

Telefono +49 2421 9 69-0 · Telefax +49 2421 9 69-199 · E-Mail: sales-de@mn-net.com

☎ 38615 / A012763 / 970 002 / 01 50 5