



Verkorte ZAHN- WELLENS test voor afvalwaters



INHOUD

1	INLEIDING	3
2	PRINCIPE.....	3
3	BIODEGRADATIEVOORWAARDEN.....	3
4	TESTVOORWAARDEN.....	3
5	MATERIAAL	4
5.1	MEDIA EN STAAL	4
5.2	GLASWERK.....	4
5.3	MEETTOESTELLEN EN MEETMETHODEN.....	4
5.4	ANDER MATERIAAL	4
5.5	BEREKENEN VAN HET BIODEGRADATIERENDEMENT.....	4
6	TESTPROTOCOL.....	5

1 INLEIDING

De beschreven biodegradatietestmethode is een 7-dagen versie van de Zahn-Wellens biodegradatietest. De methode is gebaseerd op de door de ISO beschreven methode 9888 versie 1999 (Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Static test (Zahn-wellens method)), OECD 302B Zahn-Wellens/EMPA Test (17/07/1992) en EN 29888 deel 408. Het doel is om de afbraak in een zuiveringsinstallatie na te bootsten.

De methode wordt ook gebruikt om de biologische afbreekbaarheid van de toxiciteit van een organisch gecontamineerd staal in een RWZI in te schatten.

2 PRINCIPE

De 7-dagen Zahn-Wellens test simuleert de biodegradatie van een afvalwater wanneer dat geloosd wordt op een RWZI¹. In de 7-dagen test wordt gebruik gemaakt van het actief slib afkomstig van het RWZI waarop het te testen afvalwater geloosd wordt. Het geadapteerde actief slib² wordt met een concentratie van 1 g/l droge stof toegevoegd aan het afvalwater. De biodegradatie wordt regelmatig opgevolgd door de meting van DOC³ (Dissolved Organic Carbon), vertrekkende van dag 0 = opstartdatum. 3 uur na het opstarten wordt een DOC meting uitgevoerd om DOC-verlies door adsorptie aan slib in te schatten. Het biodegradatierendement wordt bepaald door de DOC daling tov deze 3-uur waarde te berekenen.

Toxiciteitsafname wordt gemeten door een gepaste toxiciteitstest uit te voeren voor en na de biodegradatietest.

In de test wordt de afbreekbaarheid van het afvalwaterstaal en van een kunstmatig afvalwater gemeten, telkens met en zonder toevoeging van bacteriën. De conditie zonder bacteriën geeft de spontane afbraak van het afvalwater weer. De conditie met bacteriën geeft naast deze spontane afbraak ook de extra afbraak door de toegevoegde micro-organismen aan. De afbraak van het kunstmatig afvalwater wordt gebruikt als controle voor de goede werking van het inoculum.

3 BIODEGRADATIEVOORWAARDEN

Een afvalwater wordt in deze test als biologisch afbreekbaar beschouwd, wanneer het na 7 dagen voor meer dan 80% is afgebroken.

De toxiciteit wordt als afbreekbaar beschouwd wanneer de toxiciteit van het afvalwater na de biodegradatie gedaald is tot minder dan 10 TU (toxische eenheden) in de relevante ecotoxiciteitstest.

4 TESTVOORWAARDEN

- pH tss 6.5 en 8 (indien nodig de pH van het staal bijpassen)
- O₂ opgelost > 5 mg/l
- Testtemperatuur 22 °C ± 4 °C
- Test uitvoeren in een verduisterd lokaal

¹ Rioolwaterzuiveringsinstallatie

² slib afkomstig van een waterzuivering die reeds geadapteerd is aan het afvalwater dat onderzocht wordt.

³ De DOC meting kan worden vervangen door een COD (Chemical oxygen demand of chemisch zuurstof verbruik CZV) meting.

5 MATERIAAL

5.1 Media en staal

- Afvalwater: het testvolume is afhankelijk van de testdoelstellingen. Standaard is het testvolume 2 l. Indien de vistest betrokken is in de opvolging van toxiciteit voor en na biodegradatie, wordt het volume opgetrokken naar 8 l per testconditie.
- Actief slib afkomstig van het RWZI waar het te testen afvalwater wordt gezuiverd (geadapteerd actief slib). Het volume is eveneens afhankelijk van de testdoelstellingen⁴.
- Gedemineraliseerd water
- Synthetisch afvalwater (samenstelling zie tabel 1)

5.2 Glaswerk

- Bekerglas van 500 ml
- Bekerglazen: 3 of 10 l, afhankelijk van het te testen volume. 1 per testconditie
- Glasmateriaal voor het maken van verdunningen en bereiding van synthetisch afvalwater
- Maatcilinders van 2 l en 500 ml (1 per biotische testconditie)
- Potjes voor de staalname (in glas met een volume van > 10 ml, afsluitbaar met een doorprikbare capsule en rechtstreeks bruikbaar voor DOC meting)

5.3 Meettoestellen en meetmethoden

- Balans (om zowel g als mg te kunnen afwegen)
- pH en O₂ meter
- DOC metingen

5.4 Ander materiaal

- Trekkast voor het beluchten van het actief slib
- Bovenstaande roerders met bijhorend statief
- Automatische pipetten van 100 µl - 5 ml, met bijhorende tipjes
- Filters (0.45µm) + spuit (10 ml)
- Aluminiumpapier
- Beluchtingssysteem met perslucht, siliconedarmen en glazen pipetten

5.5 Berekenen van het biodegradatierendement

Adsorptie : $[\text{DOC}_{t=0} - \text{DOC}_{t=3 \text{ uur}}] / \text{DOC}_{t=0} * 100$

Biodegradatierendement = $[1 - (\text{DOC}_{\text{tijdstip=dag } t} / \text{DOC}_{\text{dag 1, 3 uur}})] * 100$

⁴ Een volume van 2.5 l actief slib afkomstig van een RWZI, geeft 5 à 6 g DS actief slib (er is 1 g/l per biotische testconditie standaard nodig)

Indien de adsorptie meer dan 20 % bedraagt, wordt in de berekening van het biodegradatierendement $DO_{Ct=0}$ als referentie gebruikt.

6 TESTPROTOCOL

Voorbereidingen

Actief slib

afpraak maken met het RWZI

Afhalen slib:

Laten bezinken – decanteren – 2*wassen met water – laten bezinken

Decanteren tot enkele cm bovenstaand water

Mengen en een staal nemen voor het bepalen van het droge stofgehalte

Slib overnacht bewaren in koelkamer

Voor gebruik tot gewenst volume brengen en minstens 2 h beluchten

Afvalwaterstaal

Meet de toxiciteit van het afvalwater in de aquatische testen: microtox, daphnia en algen.

Test de toxiciteit van het afvalwater met een limiettest voor vis bij een concentratie die gelijk is aan de laagste LC50 die in de overige 3 testen werd gemeten.

Bepaal het gevoeligste organisme. Met deze ecotoxiciteitstest wordt de afbreekbaarheid van toxische stoffen opgevolgd: toename in EC50 voor en na de biodegradatietest.

Kies overeenkomstig het volume dat je nodig hebt (en dus in de biodegradatietest moet gebruiken): 7 l wanneer de vistest de meest gevoelige is, 2 l wanneer de overige testorganismen gevoeliger zijn dan de vis.

Bepaal het DOC⁵ gehalte van het te testen afvalwater

Maak overeenkomstig het gepaste synthetische afvalwater (Tabel 1) – bewaar in de koelkast (of eventueel diepvries voor later gebruik). Gebruik hetzelfde volume in de test dan je voor het afvalwater gebruikt.

Het synthetisch afvalwater is identiek aan de samenstelling zoals beschreven in OECD 303 en heeft een DOC-gehalte vergelijkbaar aan dat van het te testen afvalwater.

Hoeveelheden kunnen overeenkomstig worden aangepast om het juiste DOC-gehalte te bekomen indien nodig.

Tabel 1 : Samenstelling van het synthetisch afvalwater

mg/l	DOC 80	DOC 150	DOC 300	DOC 600	DOC 1200
peptone	160	320	640	1280	2560
oxo	110	220	440	880	1760
ureum	30	60	120	240	480
K₂HPO₄	28	56	112	224	448
NaCl	7	14	28	56	112
CaCl₂.2H₂O	4	8	16	32	64
MgSO₄.7H₂O	2	4	8	16	32

⁵ Of COD

Opstelling

Zet bekers, roerders en beluchtingsleidingen klaar.

Per test zijn 4 bekers nodig (Tabel 2) die tijdens de test continu belucht en gemengd kunnen worden. Voor grote volumes zijn bovenstaande krachtige roerders met statief aangewezen, met de roerstaaf 5-10 cm boven de onderkant van de beker. Voor kleinere volumes is een goede beluchting meestal voldoende voor vermenging.

Tabel 2 : Standaard testopzet voor een testvolume van 2 l

		toevoegen actief slib	testconditie
staal	Afvalwater	+	biotisch
staal	Afvalwater	-	abiotisch
referentie	synthetisch afvalwater	+	biotisch
referentie	synthetisch afvalwater	-	abiotisch

Uitvoering**Dag 1**

- Bepaal het testvolume (standaard 2 liter per conditie, aan te passen in functie van de uit te voeren biotest)
- Bepaal het drooggewicht van het slib en het benodigde volume actief slib per beker (1 g DS/l).
- Vul de bekers overeenkomstig tabel 2. Voeg aan de abiotische condities eenzelfde volume water toe dan het volume slib dat aan de biotische condities wordt toegevoegd.
- Duidt met een onuitwisbare stift het eindvolume van elke beker aan, zodat later de hoeveelheden die door verdamping verloren zijn gegaan kunnen worden aangevuld (met water).
- Beluchting en roerders opstarten
- Neem uit elke beker een staal (10 ml) - filteren over 0.45 µm en in een goed afgesloten recipient bewaren (staal t=0).
- Bekers afdekken met aluminiumpapier
- Neem na 3 uur opnieuw een staal uit elke conditie (t=3h)
- meet DOC in de stalen onmiddellijk of vries in.

Dag 2-7

- Breng de bekers op het oorspronkelijke volume
- Staalname op dag 2, 3, 4 en 7 van elke testcondities (10 ml; filteren over 0.45 µm, goed afgesloten, goed geïdentificeerd)
- Meet DOC onmiddellijk of vries in.

Verwijder de stalen als biologisch en toxisch afvalwater.

Meet opnieuw de toxiciteit van het staal met het meest gevoelige testorganisme.

Is de toxiciteit voor dit organisme verdwenen, meet dan ook de toxiciteit in de overige organismen om te bepalen of alle toxiciteit werd afgebroken.

Validiteit van de test

De DOC afname in het synthetisch afvalwater onder biotische condities is een maat voor de goede werking van het inoculum. De afbraak moet meer dan 80% bedragen.

Resultaatsverwerking

Bereken op basis van de DOC-gegevens het biodegradatierendement per beker (zie hoger). De abiotische conditie geeft de spontane afbraak van het afvalwater weer, de biotische conditie geeft de biologische afbraak in RWZI condities.