

## Verkorte ZAHN- WELLENS test voor afvalwaters

---

**INHOUD**

<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Principe</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Biodegradatievoorwaarden</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Testvoorwaarden</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Materiaal</b>	<b>4</b>
5.1	<i>Media en staal</i>	4
5.2	<i>Glaswerk</i>	4
5.3	<i>Meettoestellen en meetmethoden</i>	4
5.4	<i>Ander materiaal</i>	5
5.5	<i>Berekenen van het biodegradatierendement</i>	5
<b>6</b>	<b>Testprotocol</b>	<b>5</b>
6.1	<i>Vorbereidingen</i>	5
6.2	<i>Opstelling</i>	6
6.3	<i>Uitvoering</i>	7
6.4	<i>Validiteit van de test</i>	7
6.5	<i>Resultaatsverwerking</i>	7
<b>7</b>	<b>Rapportage</b>	<b>8</b>
<b>8</b>	<b>Referenties</b>	<b>8</b>

## 1 INLEIDING

De beschreven biodegradatietestmethode is een **aangepaste** 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 **van een afvalwater** in een zuiveringsinstallatie na te bootsen.

De **hier beschreven** methode wordt gebruikt om de biologische afbreekbaarheid van de toxiciteit van een organisch gecontamineerd **afvalwaterstaal** 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 RWZI<sup>1</sup>. 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 slib<sup>2</sup> wordt met een concentratie van 1 g/l droge stof toegevoegd aan het afvalwater. De biodegradatie wordt regelmatig opgevolgd door de meting van DOC<sup>3</sup> (Dissolved Organic Carbon) **of COD (Chemical Oxygen Demand)**, vertrekkende van dag 0 = opstartdatum. 3 uur na het opstarten wordt een DOC/COD meting uitgevoerd om **DOC-verlies** door adsorptie aan slib in te schatten. Het biodegradatierendement wordt bepaald door de DOC/COD daling tov deze 3-uur waarde te berekenen.

Toxiciteitsafname wordt gemeten door een gepaste (i.e. **meest gevoelige van de klassieke 4 testen voor afvalwaterbeoordeling**) toxiciteitstest uit te voeren voor en na de biodegradatietest. **Eventueel moet de afname ook voor andere soorten bevestigd worden.**

De testopstelling is afhankelijk van het doel:

- a) De volledige test wordt opgezet wanneer je zowel de biologische als de abiotische afbraak van het afvalwaterstaal afzonderlijk wil kennen.

In de test wordt de afbreekbaarheid van het afvalwaterstaal met en zonder toevoeging van bacteriën gemeten, en als controle voor de goede werking van het inoculum wordt de biologische afbraak van kunstmatig afvalwater gemeten. . .

- b) De biotische test wordt opgezet wanneer je enkel de totale afbraak van het afvalwaterstaal (zonder het aandeel van de abiotische component te meten) hoeft te kennen.

Eventueel kan de biotische controle met kunstmatig afvalwater worden weggelaten, namelijk als men met zekerheid de goede werking van het slib (dat geadapteerd is aan het afvalwater) kent.

~~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.~~

---

<sup>1</sup> Rioolwaterzuiveringsinstallatie

<sup>2</sup> slib afkomstig van een waterzuivering die reeds gaadapteerd is aan het afvalwater dat onderzocht wordt.

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

### 3 BIODEGRADATIEVOORWAARDEN

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.

Het afvalwater wordt als goed behandelbaar beschouwd wanneer DOC/COD met 80% afneemt tijdens 7 dagen.

### 4 TESTVOORWAARDEN

- pH tss 6.5 en 8 (indien nodig de pH van het staal bijpassen)
- O<sub>2</sub> opgelost > 5 mg/l
- Testtemperatuur 22 °C ± 4 °C
- Test uitvoeren in een verduisterd of diffuus verlicht lokaal, of in donkere recipiënten.

### 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 – 16 l (afhankelijk van de vissoort (zie § 6), en afhankelijk of men een limiettest of een volledige verdunningsreeks wil testen).
- Actief slib afkomstig van het RWZI waar het te testen afvalwater wordt gezuiverd (geadapteerd actief slib). Het volume is eveneens afhankelijk van de testdoelstellingen<sup>4</sup>.
- ~~Gedemineraliseerd water~~
- **Eventueel:** 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 **gewenste** testconditie (zie onder)
- 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 O<sub>2</sub> meter
- DOC/~~COD~~ metingen

---

<sup>4</sup> 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)

#### 5.4 ANDER MATERIAAL

- Trekkast voor het beluchten van het actief slib
- ~~Bovenstaande roerders met bijhorend statief~~ gepaste roerders en beluchters voor de testrecipiënten
- Automatische pipetten ~~van 100 µl – 5 ml, met bijhorende tipjes~~
- Voor staalname: recipiënten. Filters (0.45µm) + spuitens (~~10 ml~~)
- ~~Aluminiumpapier~~
- ~~Beluchtingssyteem met perslucht, siliconedarmen en glazen pipetten~~

#### 5.5 BEREKENEN VAN HET BIODEGRADATIERENDEMENT

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

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

Indien de adsorptie meer dan 20 % bedraagt, wordt in de berekening van het biodegradatierendement  $\text{COD}/\text{DOC}_{t=0}$  als referentie gebruikt.

## 6 TESTPROTOCOL

### 6.1 VOORBEREIDINGEN

#### Actief slib

- afspraak maken met het RWZI waarop het afvalwater wordt geloosd.
- Afhalen slib:
  - Laten bezinken – decanteren – 1 à 2\*wassen met kraanwater (tot helder) – laten bezinken
  - Decanteren tot enkele cm bovenstaand water
  - Meng en een staal nemen voor het bepalen van het droge stofgehalte
  - Indien nodig: Slib overnacht bewaren in koelkamerbeluchten bij kamertemperatuur. Eventueel voeden met artificieel afvalwater.
  - Voor gebruik tot gewenst volume brengen en minstens 2 h beluchten

#### Afvalwaterstaal

De stalen steeds bewaren in het donker bij 4°C. De testen worden bij voorkeur op de dag van de staalname opgestart, maar een marge van 1 dag wordt om praktische redenen getolereerd, op voorwaarde dat het staal koel en donker bewaard wordt. Indien de test pas later kan uitgevoerd worden is het toegelaten het afvalwaterstaal in te vriezen ( $\leq -18^\circ\text{C}$ ). Vermeld wel steeds de datums van aankomst en van testuitvoering in het rapport, en de bewaarcondities.

- Meet de toxiciteit van het afvalwater in de aquatische testen: microtox, daphnia, algen en vis\*. \*voor afvalwaters wordt in Vlaanderen standaard de forel als testorganisme gebruikt, maar voor de opvolging van de toxiciteit kan om praktische reden (kleinere volumes) ook de zebravis gebruikt worden.
- Bepaal het gevoeligste organisme. Met testen op dit organisme wordt de afbreekbaarheid van toxische stoffen opgevolgd als toename in EC50 voor en na de biodegradatietest.

- Kies overeenkomstig het volume dat je nodig hebt (en dus in de biodegradatietest moet gebruiken): 8-16 l wanneer de vis de meest gevoelige soort is, 2 l wanneer een van de overige testorganismen gevoeliger is dan de vis.
- Bepaal het DOC<sup>5</sup> gehalte van het te testen afvalwater
- Indien je een volledige test wil opzetten:
- Maak overeenkomstig het **DOC gehalte van het te testen afvalwater** 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
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28	56	112	224	448
NaCl	7	14	28	56	112
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4	8	16	32	64
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2	4	8	16	32

## 6.2 OPSTELLING

(zie hoger: afhankelijk van het doel kies je de opstelling)

Zet bekertjes, roerders en beluchtungsleidingen klaar.

Voor een volledige test:

Per test zijn 3 bekertjes nodig (Tabel 2) die tijdens de test continu belucht worden en waarvan de inhoud geroerd kan 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

<sup>5</sup> Of COD

### 6.3 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 (1g DS/l).
- Vul de bekera ~~overeenkomstig tabel 2~~. Voeg (indien van toepassing) aan de abiotische conditie eenzelfde volume water toe dan het volume slib dat aan de biotische condities wordt toegevoegd.
- Duid 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 roeders opstarten
- **Neem uit elke beker een staal - filteren over 0.45 µm, en aanzuren. In een goed afgesloten recipiënt bewaren (staal t=0) in de koelkast indien de DOC/COD metingen niet onmiddellijk gebeuren.**
- **Bekera afdekken**
- **Neem na 3 uur opnieuw een staal uit elke conditie (t=3h), filteren over 0.45 µm, en aanzuren. In een goed afgesloten recipiënt bewaren (staal t=3h) in de koelkast indien de DOC/COD metingen niet onmiddellijk gebeuren.**
- **Meet DOC/COD in de stalen binnen een periode van 7 dagen na staalname of vries de stalen in.**

#### Dag 2-7

- Breng de bekera op het oorspronkelijke volume
- **Staalname van elke testcondities op regelmatige tijdstippen (minstens 3 x waarvan de laatste op dag 7) (filteren over 0.45 µm, aanzuren, onmiddellijk COD/DOC meten of recipiënten goed afgesloten bewaren in de koelkast, goed geïdentificeerd)**
- **Meet COD/DOC ten laatste 7 dagen na staalname.**

Verwijder de stalen als biologisch en toxisch afvalwater.

Meet opnieuw de toxiciteit van het staal **na biodegradatie** met het meest gevoelige testorganisme. **Is de toxiciteit voor dit organisme verdwenen/gedaald, meet eventueel ook de toxiciteit in de overige organismen om te bevestigen of inderdaad alle toxiciteit werd afgebroken.**

### 6.4 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.

**In testen waarin geen controle wordt meegetest wordt de goede werking van het inoculum bevestigd indien er een vlotte afbraak wordt gemeten. Indien er geen of weinig afbraak wordt gemeten kunnen de resultaten twijfelachtig zijn.**

### 6.5 RESULTAATSVERWERKING

Bereken op basis van de **COD/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.

## 7 RAPPORTAGE

Het rapport bevat indien mogelijk:

- Samenvatting van de resultaten
- Referentie naar het protocol dat gevolgd wordt
- Uitvoeringsdata
- Informatie over het monster
  - herkomst, code, aard, ...
  - Gemeten randvoorwaarden: indien niet voldaan moet dit duidelijk gerapporteerd worden en de mogelijke invloed op de resultaten worden aangegeven
- Informatie over het inoculum
- Samenstelling synthetisch afvalwater (indien van toepassing)
- Testverloop (specifieke testcondities, informatie over het meetsysteem, afwijkingen van het protocol)
- Informatie over de berekeningswijzen
- Resultaten
  - Resultaten van de toxiciteitstesten voor en na de degradatie
  - Afbreekbaarheid (afname in COD/DOC per tijdseenheid)
  - Afbreekbaarheid van de toxische fractie (afname van het aantal TE voor tenminste de meest gevoelige soort)
  - Grafieken
    - Afname COD/DOC in functie van de tijd
    - Toxiciteitscurven (concentratie-effect curven voor en na degradatie; tenminste voor de meest gevoelige soort)
  - Bespreking van de resultaten en eventuele invloeden door externe factoren/afwijkingen tijdens de test.

## 8 REFERENTIES

- OECD guidelines for testing chemicals N° 302b (1992): Inherent biodegradability: Zahn Wellens/EMPA test
- ISO 9888 (1999) Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Static test (Zahn-wellens method)