

## Zahn-Wellens test op afvalwaters: bioelimineerbaarheid van DOC en toxiciteit na 7 tot 28 dagen behandeling

## INHOUD

<b>1</b>	<b>Toepassingsgebied</b>	<b>3</b>
<b>2</b>	<b>Principe van de testen</b>	<b>3</b>
<b>3</b>	<b>Definities</b>	<b>4</b>
<b>4</b>	<b>Apparatuur en materiaal</b>	<b>4</b>
<b>5</b>	<b>Reagentia en oplossingen</b>	<b>5</b>
<b>6</b>	<b>Monster afvalwater</b>	<b>5</b>
<b>7</b>	<b>Actief slib van een biologische WZI</b>	<b>5</b>
<b>8</b>	<b>Werkwijze Zahn-Wellens behandeling</b>	<b>6</b>
8.1	<i>Bereiding mineraal medium</i>	6
8.2	<i>Testcondities</i>	7
8.3	<i>Testuitvoering</i>	8
8.4	<i>Evaluatie van Zahn-Wellens behandeling</i>	10
8.4.1	Berekening van het bioeliminatie rendement	10
8.4.2	Resultaat van DOC verwijdering en toxiciteit	10
8.5	<i>Kwaliteitscontrole</i>	11
8.5.1	Eerstelijnscontrole	11
8.5.2	Tweedelijnscontrole	11
8.5.3	Opvolging van afwijkingen	11
8.6	<i>Rapportage</i>	11
<b>9</b>	<b>Referenties</b>	<b>12</b>

## 1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een simulatie van afbraak van organische koolstofverbindingen ter hoogte van een biologische waterzuiveringsinstallatie (WZI).

Bedrijfsafvalwaters die geloosd worden op een biologische WZI moeten geëvalueerd worden of ze geschikt zijn voor aansluiting op de WZI door bioelimineerbaarheid van de aanwezige organische C-verbindingen (te meten als DOC) en van de acute toxiciteit te testen. Deze evaluatie gebeurt na behandeling van het afvalwater in een Zahn-Wellens test, een methode beschreven in internationale richtlijnen (OECD302b, 1992 en ISO 9888, 1999).

Deze WAC-procedure beschrijft de 28 dagen Zahn-Wellens bioeliminatie test waarbij de C-verwijdering gemeten wordt in functie van de tijd gevolgd door een evaluatie van toxiciteit na 28 dagen behandeling. Indien er een goede C-verwijdering is na 7 dagen behandeling ( $\geq 70\%$ ), dan zal de toxiciteit meteen daarna gemeten worden en kan de Zahn-Wellens test verkort worden. De verwijdering van organische C-verbindingen en de toxiciteit worden gemeten met erkende WAC-procedures.

## 2 PRINCIPE VAN DE TESTEN

In de 28 dagen Zahn-Wellens test wordt de bioelimineerbaarheid of verwijdering van organisch C-verbindingen in een statische opstelling geëvalueerd. Bioelimineerbaarheid is het totaal van enerzijds de biodegradatie, of afbraak van organische C-verbindingen in afvalwater door de activiteit van aerobe micro-organismen aanwezig in het actief slib en anderzijds de C-verwijdering uit het afvalwater door adsorptie aan het actief slib. Industrieel afvalwater wordt bij een bepaalde range aan opgelost organisch koolstof (DOC 50 - 400 mg/l, of 100 - 1000 mg/l chemisch zuurstofverbruik, CZV) geïncubeerd met een hoge concentratie van actief slib (1 g droge stof/l afvalwater) van de ontvangende WZI, en de afname van DOC wordt gemeten in functie van de tijd tot 28 dagen. Een typische degradatie curve omvat een lag fase, een logaritmische toename van C-verwijdering en een plateaufase. Het afvalwater wordt na de behandeling getest voor acute toxiciteit, en wordt daarom in deze opstelling beperkt verdund (max. tot 80%).

Op het einde van de 28 dagen behandeling in de Zahn-Wellens test wordt de totale DOC-verwijdering gemeten, en wordt de acute toxiciteit gemeten. Echter indien de resultaten van DOC-meting in functie van de tijd reeds een verwijdering van  $\geq 70\%$  op dag 7 tonen, dan wordt de acute toxiciteit getest zodra het DOC-resultaat gekend is (ten laatste op dag 11), en wordt de Zahn-Wellens test gestopt<sup>1</sup>.

De afname van DOC in deze Zahn-Wellens test kan een gevolg zijn van:

- Adsorptie aan slib, die voornamelijk tijdens de eerste 3 uur optreedt.
- De ultieme afbraak tot gasvormig CO<sub>2</sub> die uit de opstelling verdwijnt als gevolg van zowel abiotische processen (hydrolyse, fotodegradatie ...), als biologische afbraak door micro-organismen (biodegradatie). In deze procedure wordt er niet afzonderlijk getest voor het aandeel van de abiotische afbraak bij de totale afname van DOC.
- Onvolledige afbraak tot kleinere moleculen is niet zichtbaar in de meting van C-afname.

---

<sup>1</sup> In overleg met de klant kan een duplo opstelling voorzien worden voor behandeling van het afvalwater, die toelaat om op 2 tijdstippen de toxiciteit te meten (mogelijk nuttig indien acute toxiciteit op 1<sup>ste</sup> tijdstip niet verwijderd is ondanks de  $\geq 70\%$  DOC-verwijdering op 7 dagen).

De totale afname van DOC op elk van de tijdstippen voor monsternamen wordt berekend en is een maat voor de bioelimineerbaarheid van organische C-verbindingen door biologische zuivering als resultaat van adsorptie en biodegradatie. Via de evaluatie van toxiciteit op hetzij 7 dagen, hetzij 28 dagen behandelde afvalwater kan er aangetoond worden of de DOC-verwijdering gepaard gaat met een bioeliminatie van acute toxiciteit.

De Zahn-Wellens test wordt met een zo hoog mogelijke concentratie van het afvalwater uitgevoerd ( $\geq 80\%$ , Gartiser et al, 2010), mits deze conditie geen acute toxiciteit veroorzaakt voor het actief slib. Dit wordt getest met een toxiciteitscontrole, namelijk een testconditie met een goed afbreekbare stof toegevoegd aan het afvalwater (zie 3 Definities).

### 3 DEFINITIES

- Bioeliminatie: het resultaat van enerzijds biodegradatie, of afbraak van organische C-verbindingen door de activiteit van aerobe micro-organismen aanwezig in het actief slib en anderzijds de C-verwijdering door adsorptie aan het actief slib.
- Criteria voor goede bioeliminatie: het afvalwater wordt beschouwd als goed behandelbaar indien het DOC-gehalte over de beoogde periode met minstens 70% afneemt.
- Geadapteerd slib: actief slib van de ontvangende biologische WZI voor het bedrijfsafvalwater wordt gebruikt in de Zahn-Wellens test. Er wordt in het labo geen verdere adaptatie van het slib voor het industrieel afvalwater voorzien. De duurtijd van 28 dagen behandeling in de klassieke Zahn-Wellens test simuleert een adaptatie van het slib zoals in een biologische WZI.
- Positieve controle: een testconditie om de performantie van het actief slib te controleren tijdens de Zahn-Wellens opstelling. Hiervoor wordt een gekende, goed afbreekbare stof in mineraal medium, bijv. aniline opgezet die moet voldoen aan criteria voor goede bioeliminatie.
- Toxiciteitscontrole: de gekende goed afbreekbare stof, bijv. aniline wordt in het afvalwater gedoseerd, en de afbraak wordt gevolgd in vergelijking met de positieve controle conditie, namelijk aniline in het optimale mineraal medium met eenzelfde dosering van actief slib. Een verminderde afbraak van aniline in de toxiciteitscontrole kan wijzen op toxiciteit van het afvalwater voor het actief slib.

### 4 APPARATUUR EN MATERIAAL

- Zuurstofmeter voor meting conform WAC/III/A/008.
- Thermometer en logger voor registratie van min. en max. temperatuur.
- pH-meter voor meting van pH conform WAC/III/A/005.
- Geleidbaarheidsmeter
- Analytische balans, aflezing tot 0.1 mg.
- Klimaatkamer of incubator met instelbare temperatuur (20-25)°C, en maximum variatie van 2 °C gedurende volledige periode van incubatie, met diffuus licht, of volledig donker tijdens incubatie.
- Beluchting systeem (olie-vrij).
- Pipetten en toebehoren.
- Standaard labo glasmateriaal: maatkolven, maatcilinders voor bereiding van testoplossingen.
- Glazen recipiënten van minstens 2 liter<sup>2</sup>.
- Bovenstaande regelbare roerder

---

<sup>2</sup> Grotere testvolumes, dus aangepaste recipiënten zijn nodig indien de acute toxiciteit voor forel moet gemeten worden na Zahn-Wellens behandeling.

- Droogstoof
- Filtratieopstelling, en filters (0.45 µm)
- Spuiten met wegwerpfiler 0.45 µm
- TOC- of DOC-apparaat te gebruiken volgens WAC/III/D/050

## 5 REAGENTIA EN OPLOSSINGEN

- Gedemineraliseerd water (< 10 µS/cm, en < 1 mg/l DOC).
- Zouten (zie Tabel 3) van analytische kwaliteit voor de bereiding van mineraal medium.
- 1N HCl en 1N NaOH voor pH aanpassing.
- Aniline (Cas 62-53-3; C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>NH<sub>2</sub>: 77.4% C-gehalte), van analytische kwaliteit en wordt gebruikt als positieve controle of referentiestof. Een oplossing van 258 mg/l aniline in mineraal medium komt overeen met 200 mg/l C.

## 6 MONSTER AFVALWATER

Het afvalwater voor behandeling in de Zahn-Wellens test kan voor toxiciteit getest worden volgens een limiettest zoals beschreven in de WAC-procedures ecotoxiciteit voor organismen. De keuze van testorganisme(n) voor acute toxiciteit wordt afgesproken met de vergunningverlenende overheid en/of de klant.

Voor de monsternamen en houdbaarheid van het afvalwater wordt verwezen naar respectievelijk WAC/I/A/003, WAC/I/A/004 en WAC/I/A/010.

Bij gebruik voor fysicochemische metingen om de randvoorwaarden voor de toxiciteitstesten te controleren wordt een gehomogeniseerd en representatief deelstaal genomen, en op kamertemperatuur gezet. De fysicochemische parameters, zoals pH, zuurstof, geleidbaarheid ... worden gemeten omdat deze binnen bepaalde ranges (randvoorwaarden, zie WAC-procedures voor ecotoxiciteit) moeten vallen. Bovendien zal de meting van geleidbaarheid de keuze van testorganisme(n) bepalen binnen de groep van vissen, algen of invertebraten die gebruikt zullen worden bij evaluatie van de acute toxiciteit van het behandelde afvalwater.

Er wordt onmiddellijk bij ontvangst in het labo een DOC-analyse uitgevoerd op het afvalwater, tenzij relevante oudere meetgegevens beschikbaar zijn, om na te gaan of het afvalwater voldoet aan de vooropgestelde werkrange voor DOC 50-400 mg/l en rekening houdend met een verdunning tot max. 80%.

## 7 ACTIEF SLIB VAN EEN BIOLOGISCHE WZI

Actief slib moet afkomstig zijn uit het beluchtingsbekken van de biologische WZI waar het te testen afvalwater wordt gezuiverd (geadapteerd actief slib). Het actief slib wordt vers opgehaald bij de WZI.

Voor de houdbaarheid van het actief slib wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

Er wordt binnen 4 u na monsternamen van het slib gestart met de voorbereidende stappen, zodat de behandeling in de Zahn-Wellens test binnen 24 u na monsternamen kan starten:

- Slib monster goed mengen, vervolgens laten bezinken, decanteren en bovenstaande vloeistof afvoeren<sup>3</sup>.
- Het slib wassen met mineraal medium (zie 8.1), laten bezinken en supernatans verwijderen tot enkele cm boven bezinklaag. Deze handeling wordt 2 à 3x herhaald tot supernatans helder wordt. Het slib moet voldoende ingedikt zijn, zodat toevoeging aan het afvalwater of het mineraal medium max. 20% is van het totaal volume afvalwater. Indien noodzakelijk om voldoende geconcentreerd slib te bekomen is centrifugatie toegestaan (2500 rpm – 10 min). Bij centrifugatie aandacht geven aan temperatuur die niet mag oplopen boven kamertemperatuur (20-25)°C.
- Voeg al het gewassen slib samen, en voeg mineraal medium toe tot enkele cm boven sliblaag, homogeniseer en neem een deelstaal (bijv. 100 ml) voor bepaling van drooggewicht.
- Ten minste 2 uur voor aanvang van de Zahn-Wellens test moet de benodigde hoeveelheid slib op kamertemperatuur (20-25)°C belucht worden.
- Bepaling van drooggewicht van het actief slib: weeg 0.45 µm papierfilter (bijv. 10 cm φ), filtreer het actief slib over deze filter, laat de filter overnacht drogen bij 105°C in oven (tot constant gewicht), en bepaal achteraf het gewicht filter + droog slib.

Bereken het droge stof (ds) gehalte van het slib uitgedrukt in mg/liter. Dit wordt gebruikt om in de Zahn-Wellens het slib volumetrisch te doseren aan ( $1 \pm 0.1$ ) g droge stof (ds) per liter afvalwater of mineraal medium.

## 8 WERKWIJZE ZAHN-WELLENS BEHANDELING

### 8.1 BEREIDING MINERAAL MEDIUM

De nodige hoeveelheid mineraal medium wordt bereid, met een samenstelling zoals beschreven in volgende Tabel 1. De samenstelling is deze die beschreven is in OECD 302b (1992) en ISO 9888 (1999) waarbij vertrokken wordt van verschillende stockoplossingen van zouten.

- Maak 1 liter van stockoplossing A met  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (hoeveelheden in tabel) in gedemineraliseerd water. Controleer de pH, en stel bij indien nodig tot pH 7.4.
- Maak 1 liter van stockoplossing B met  $\text{CaCl}_2$  (hoeveelheid in tabel) in gedemineraliseerd water.
- Maak 1 liter van stockoplossing C met  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (hoeveelheid in tabel) in gedemineraliseerd water.
- Maak 1 liter van stockoplossing D met  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (hoeveelheid in tabel), en voeg eveneens 0.4 g  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  voor langere bewaartijd, en leng aan met gedemineraliseerd water.

De stockoplossingen worden koel bij ( $5 \pm 3$ )°C en in het donker bewaard gedurende max. 6 maanden. Indien er neerslag is van zouten, dan wordt een nieuwe oplossing gemaakt.

Voor de bereiding van mineraal medium wordt stockoplossing A 100x, en stockoplossingen B, C en D 1000x verdund in gedemineraliseerd water. Dus voor een volume van 5 liter mineraal medium, wordt eerst 4.5 liter gedemineraliseerd water in een recipiënt gebracht, er wordt 50 ml stockoplossing A, 5 ml stockoplossing B, 5 ml stockoplossing C en 5 ml stockoplossing D toegevoegd en vervolgens aangevuld met gedemineraliseerd water tot aan de maatstreep. Meet de pH, en stel bij met zuur of base, indien nodig, zodat de pH van het mineraal medium gelijk is aan  $7.0 \pm 0.5$ .

<sup>3</sup> Uitzonderlijk, indien er slechte bezinking is van het actief slib, kan er overnacht belucht worden bij kamertemperatuur (20-25)°C, waarna er betere bezinking mogelijk is, om vervolgens te decanteren. Dit is een afwijking van methode en wordt als dusdanig gerapporteerd.

Dit medium kan max. 1 maand bewaard worden in de koelkast bij  $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ .

**Tabel 1: Samenstelling van stockoplossingen van zouten en eindconcentratie van de bereiding van mineraal medium.**

Component	Stockoplossing		Concentratie in mineraal medium (mg/l)
	Naam	Hoeveelheid (g/l)	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	A	8.5	85
$\text{K}_2\text{HPO}_4$		21.75	217.5
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		33.4	334
$\text{NH}_4\text{Cl}$		0.5	5
$\text{CaCl}_2$	B	27.5	27.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	C	22.5	22.5
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	D	0.25	0.248

Het mineraal medium wordt gebruikt voor

- Wassen van vers actief slib voor aanvang van de test
- Verdunnen van slib op basis van droge stof bepaling om te doseren aan 1 gram droge stof per liter afvalwater (en mits aandeel slib < 20% van totaal testvolume)
- Bereiding van testoplossing met de positieve controle, aniline
- Aanvullen van testoplossingen tot oorspronkelijk volume bij verwijderen van testoplossingen voor monstername DOC.

## 8.2 TESTCONDITIES

Een testopstelling omvat glazen recipiënten van voldoende volume maar beperkt contactoppervlak met de lucht (om verdamping te beperken), regelbare bovenroeders en beluchting, geplaatst in een testkamer met temperatuurcontrole ( $20\text{-}25^\circ\text{C}$ ). Er is aandacht bij instelling van de roeders voor beperkte zuurstofinbreng en vermijden van deeltjesverkleining.

De testopstelling wordt voorzien voor een duur van 28 dagen, met mogelijkheid om vroegtijdig stop te zetten na beschikbaarheid van resultaten DOC-afbraak van monstername op 7 dagen, en mits DOC-verwijdering  $\geq 70\%$  is. Zodra dit resultaat gekend is (ten laatste op dag 11) kan de Zahn-Wellens behandeling gestopt worden. Indien van toepassing voorziet men op dat tijdstip een monstername van het behandelde afvalwater om acute toxiciteit te meten<sup>4</sup>.

De procedure voorziet standaard minstens 3 testrecipiënten<sup>5</sup>, waarbij 2 liter per recipiënt voldoende is voor uitvoering van analyses (DOC & toxiciteit), uitgezonderd indien de foreltest moet uitgevoerd worden en men aangepaste volume afvalwater en slib voorziet per testconditie:

- Afvalwater (eventueel  $2 \times$ )<sup>5</sup>
- Referentie
- Tox-controle

De testrecipiënten worden gevuld volgens het schema in Tabel 2, en worden voorzien van roeders en continue beluchting.

<sup>4</sup> Optioneel, in overleg met de klant, wordt een duplo conditie voor behandeling van het afvalwater voorzien zodat acute toxiciteit, indien relevant, op 2 tijdstippen kan getest worden.

<sup>5</sup> Optioneel 4 testrecipiënten, indien afvalwater met slib in duplo wordt opgesteld voor toxiciteit meting op 2 tijdstippen.

Het niveau van de testoplossing wordt, in stilstande fase, gemarkeerd op het recipiënt.

**Tabel 2: Overzicht van opstelling in Zahn-Wellens test met verschillende testcondities**

Testcondities & identificatie test recipiënt	Afvalwater: 7 d – 28 d (Recipiënt 1)	Referentie: 7 d - 28 d (Recipiënt 2)	Tox-controle: 7d - 28 d (Recipiënt 3)
Afvalwater	<b>X</b>		<b>X</b>
Mineraal medium		<b>X</b>	
Aniline (258 mg/l)		<b>X</b>	<b>X</b>
Actief slib, (1 ± 0.1) g ds/l	<b>X</b>	<b>X</b>	<b>X</b>

De test wordt in optimale condities uitgevoerd met een startconcentratie DOC in de range 50-400 mg/l. Voor de evaluatie van de toxiciteit in het afvalwater na de Zahn-Wellens test wordt het afvalwater best onverdund getest, of bij minstens 80% rekening houdend met het DOC-criterium en de toevoeging van geconcentreerd actief slib (terwijl de oorspronkelijke ecotoxiciteit zo weinig mogelijk verdund wordt).

De referentiestof, aniline, wordt gedoseerd aan een DOC-gehalte van 200 mg/l.

Door dezelfde hoeveelheid aniline zowel in mineraal medium met actief slib (referentie), als in afvalwater met actief slib (Tox-controle) te testen, zal men de toxiciteit van het afvalwater voor het actief slib kunnen inschatten door de bioeliminatie van aniline, in de vorm van DOC-vermindering in beide condities te vergelijken. Een toxiciteitscontrole is nuttig voor de interpretatie van de resultaten in geval er geen of beperkte DOC-afbraak in het afvalwater wordt waargenomen bij vergelijking met de referentie: de toxiciteitscontrole laat in dat geval toe een indicatie te krijgen van toxiciteit voor het actief slib of aanwezigheid van persistente verbindingen in het afvalwater.

### 8.3 TESTUITVOERING

#### Dag 0:

- Label en vul de recipiënten overeenkomstig de testcondities volgens Tabel 2, uitgezonderd het actief slib.
- Meet pH, zuurstof en temperatuur, en neem een 40 ml staal voor DOC-analyse op tijdstip T0, start van de test.
- Onmiddellijk wordt het actief slib, dat gedurende 2 u voor start van de test belucht en geacclimatiseerd werd op 20-25°C, in elk recipiënt gedoseerd aan een concentratie van (1 ± 0.1) g ds/l testvolume. Markeer het eindvolume op elk recipiënt, zodat later de hoeveelheden die door verdamping verloren zijn gegaan, kunnen worden aangevuld met leidingwater.
- Start de roeders, en beluchting en regel zodanig dat het slib niet gaat bezinken, en er geen zuurstofsaturatie ontstaat. De recipiënten worden zo goed mogelijk afgesloten om het contactoppervlak met de lucht te beperken en verdamping minimaal te houden.

#### Dag 1 – 6:

- Voor 2 tussentijdse monsternames gespreid in de tijd<sup>6</sup>: namelijk op (24 ± 2) u of dag 1 en op (72 ± 2) u of dag 3. Zet de roeders stil, en controleer het volume en leng aan tot het oorspronkelijk volume met leidingwater gevolgd door goed mengen. Meet pH, zuurstof en temperatuur en

<sup>6</sup> Rekening houdend met weekend- en feestdagen kan de monstername op dag 3 vervangen worden door een monstername op dag 4, op (96 ± 2) u.



neem opnieuw een 40 ml staal voor DOC-analyse in elk recipiënt. Indien de pH per recipiënt meer dan 0.5 pH eenheden afwijkt t.o.v. deze op tijdstip 0, dan wordt die terug aangepast. Compenseer het testvolume met mineraal medium voor het afgenomen monstervolume voor DOC. Start de roerders, en de beluchting.

**Dag 7:**

- Zet de roerders stil, en breng de recipiënten op het oorspronkelijke volume met leidingwater met goed mengen. Meet pH, zuurstof en temperatuur, en neem een 40 ml staal voor DOC-analyse uit elk recipiënt. Indien de pH per recipiënt meer dan 0.5 pH eenheden afwijkt t.o.v. deze op tijdstip 0, dan wordt die terug aangepast. Het monsternamevolume voor DOC wordt gecompenseerd met mineraal medium. De roerders en beluchting worden opgezet. In afwachting van resultaten voor DOC-analyse tot en met dag 7 zal de Zahn-Wellens behandeling verder blijven lopen.

**Dag 7-11:**

- DOC-analyses worden uitgevoerd en bioeliminatie in functie van de tijd gedurende 7 dagen wordt ten laatste op dag 11 berekend voor alle testcondities (zie 8.4.1). Indien de verwijdering  $\geq 70\%$  zal het behandelde afvalwater getest worden voor acute toxiciteit. Wanneer  $< 70\%$  DOC-verwijdering, dan loopt de volledige opstelling door (ga naar **Dag 14 & dag 21**).
- Bij DOC-verwijdering  $\geq 70\%$ , dan stopt de Zahn-Wellens behandeling en wordt het 1<sup>ste</sup> recipiënt met afvalwater en actief slib uit de testopstelling genomen om het behandelde afvalwater te collecteren voor een toxiciteitstest (na max. 11 dagen behandeling). Beluchting en roerder worden afgezet, om het slib te laten bezinken. Na 1 à 2 uur wordt de bovenstaande vloeistof verzameld (volume overeenkomstig uit te voeren testen) via decanteren. Indien een algentest of de bacterietest wordt uitgevoerd dan wordt het behandelde afvalwater gefiltreerd (0.45  $\mu\text{m}$  membraanfilter). Voor de andere testen, indien een helder supernatans kan verzameld worden, zal dit staal rechtstreeks gebruikt worden. Indien bezinking niet optimaal is, zal het volledige staal gefiltreerd worden om actief slib deeltjes te verwijderen. Het behandelde afvalwater wordt vervolgens geëvalueerd in de toxiciteitstest(en) ten laatste op dag 11 na start van de Zahn-Wellens behandeling.

Volgende handelingen met verderzetting van de Zahn-Wellens test tot 28 dagen zijn nodig indien de meetresultaten van 7 dagen behandeling aantonen dat de DOC-verwijdering minder is dan 70%<sup>7</sup>.

**Dag 14 & dag 21:**

- Zet de roerders stil, en controleer het volume en leng aan met leidingwater tot het oorspronkelijk volume, met goed mengen. Meet pH, zuurstof en temperatuur en neem opnieuw een 40 ml staal voor DOC-analyse in elke recipiënt. Indien de pH per recipiënt meer dan 0.5 pH eenheden afwijkt t.o.v. deze op tijdstip 0, dan wordt die terug aangepast. Compenseer het monsternamevolume voor DOC met mineraal medium, start de roerders en de beluchting, en dek de recipiënten af.

**Dag 28:**

- Zet de roerders stil, en breng de recipiënten op het oorspronkelijke volume met leidingwater en goed mengen. Meet pH, zuurstof en temperatuur, en neem een staal voor DOC-analyse uit elk recipiënt.
- Neem het recipiënt met afvalwater en actief slib uit de testopstelling, om het behandeld afvalwater te collecteren voor toxiciteitstest(en) op 28 dagen. Beluchting en roerder worden afgezet, en laat bezinken. Na 1 à 2 uur wordt de bovenstaande vloeistof verzameld via decanteren (volume overeenkomstig uit te voeren toxiciteitstesten). Indien een algentest of de bacterietest uitgevoerd wordt, dan wordt het behandelde afvalwater gefiltreerd (0.45  $\mu\text{m}$ ). Voor de andere testen, indien een helder supernatans kan verzameld worden, zal dit staal

---

<sup>7</sup> Optioneel, mits overleg met de klant, zal een duplo recipiënt voorzien zijn om door te lopen tot 28 dagen behandeling voor een 2<sup>de</sup> test op acute toxiciteit, nadat er bij 1<sup>ste</sup> evaluatie toch nog acute toxiciteit gemeten werd ( $> 50\%$  effect in limiettest) hoewel aan het criterium voor DOC-eliminatie  $\geq 70\%$  op 7 dagen voldaan werd.

rechtstreeks gebruikt worden. Indien bezinking niet optimaal is, dan zal ook voor de andere testen het volledige monster gefiltreerd worden om actief slib deeltjes te verwijderen. Het 28 dagen behandelde afvalwater wordt koel ( $5 \pm 3$ )°C bewaard tot aanvang van de toxiciteitstest(en), die binnen 24 u na verzamelen moeten gestart worden.

## 8.4 EVALUATIE VAN ZAHN-WELLENS BEHANDELING

### 8.4.1 BEREKENING VAN HET BIOELIMINATIE RENDEMENT

Bioeliminatie is het resultaat van biodegradatie en van adsorptie. Er wordt geen afzonderlijke monsternamen voorzien op 3 u (voor adsorptie), zodanig dat het rendement voor bioeliminatie het gecumuleerd resultaat is van beide fenomenen berekend uit DOC-meting op tijdstip dag T in vergelijking met DOC-meting bij start van de behandeling (dag 0).

Bioeliminatie rendement, wordt berekend als

$$\% \text{ DOC verwijdering} = \left(1 - \frac{DOC_{dag T}}{DOC_{dag 0}}\right) * 100$$

De resultaten van DOC-meting (mg O<sub>2</sub>/l) in functie van de tijd van monsternamen worden grafisch voorgesteld per testconditie alsook het bioeliminatie rendement (% DOC-verwijdering) voor de looptijd van de Zahn-Wellens test (7 dagen of 28 dagen).

### 8.4.2 RESULTAAT VAN DOC VERWIJDERING EN TOXICITEIT

Het bioeliminatie rendement voor de referentieconditie moet voldoen aan het criterium DOC-verwijdering  $\geq 70\%$ . Het resultaat wat betreft DOC-verwijdering in de conditie toxiciteitscontrole moet vergelijkbaar zijn met die van de referentieconditie (curves van DOC-meting lopen parallel), tenzij het afvalwater toxisch zou zijn voor het actief slib en aniline minder snel afbreekt. In dat geval dienen de resultaten voor bioeliminatie rendement van het afvalwater met de nodige voorzichtigheid geïnterpreteerd te worden.

Indien het resultaat voor bioeliminatie in het afvalwater na 7 dagen reeds voldoet aan het criterium  $\geq 70\%$  dan kan men stellen dat het afvalwater goed behandelbaar is. Is dit niet het geval, dan zou door langere contacttijd met het slib in de 28 dagen behandeling een verdere afbraak nog mogelijk kunnen zijn. De DOC-verwijdering wordt geëvalueerd op 28 dagen en indien voldaan wordt aan het criterium  $\geq 70\%$  verwijdering is het afvalwater behandelbaar in de WZI.

Als de toxiciteitsresultaten van een test op het 7 dagen behandelde afvalwater, waar er  $\geq 70\%$  DOC-verwijdering was, geen acute toxiciteit geven (% effect in limiettest < 50%), dan is het afvalwater geschikt voor behandeling in de biologische WZI.

Indien er goede DOC-verwijdering is ( $\geq 70\%$ ) in het afvalwater na 7 dagen, terwijl er in de acute toxiciteit test nog  $\geq 50\%$  effect gemeten wordt, dan kan dit duiden op een aandeel van persistente verbindingen in het afvalwater die verantwoordelijk zijn voor de gemeten acute toxiciteit<sup>8</sup>.

---

<sup>8</sup> Optioneel kan, ondanks 70% DOC-verwijdering, de behandeling in een duplo recipiënt (mits akkoord van de klant) nog uitgevoerd worden tot 28 dagen en opnieuw getest worden voor vermindering van toxiciteit door verdere bioeliminatie, mede mogelijk door betere adaptatie van het slib aan het afvalwater. Dit kan ook relevant zijn, en bevestigd worden bij

Het gemeten rendement voor afbraak in deze opstelling omvat de totale eliminatie bij een actief slibbehandeling, waarbij zowel abiotische en biologische verwijdering van DOC in WZI-condities beschouwd worden. Niet alleen de ultieme afbraak, maar ook onvolledige afbraak tot minder (of juist meer) schadelijke intermediaire stoffen kunnen een impact hebben op de verandering van toxiciteit.

## 8.5 KWALITEITSCONTROLE

### 8.5.1 EERSTELIJNSCONTROLE

#### *Beslissingscriterium voor geldigheid van de test:*

- De DOC-afname van de referentiestof onder biotische condities in mineraal medium is een maat voor de goede werking van het inoculum van het actief slib. De afbraak moet minstens 70% bedragen na 7 dagen en 28 dagen.
- Resultaten met de referentiestof, met % DOC-verwijdering na 7 dagen en 28 dagen worden geregistreerd in een controle kaart.

#### *Herkomst en kwaliteit van testorganismen:*

- Gegevens van het gebruikte actief slib en voorbehandeling worden geregistreerd.

### 8.5.2 TWEDELIJNSCONTROLE

De methode toegepast in het labo wordt op de hieronder vermelde frequenties uitgevoerd met een afvalwater waarvoor de % DOC-verwijdering in duplo bepaald wordt na 7 d en 28d:

- De minimale frequentie voor een intralaboratorium test is als volgt:
  - Bij wekelijkse uitvoering van de test: driemaandelijks testen.
  - Bij maandelijkse uitvoering: halfjaarlijks testen.
- Bovendien zal ieder van de betrokken uitvoerders minstens 1 maal per jaar een test uitvoeren.

### 8.5.3 OPVOLGING VAN AFWIJKINGEN

Indien de resultaten van de referentie stof, of de test met duplo monsters niet voldoen aan de vooropgestelde criteria, dan dient een analyse van de oorzaak en reikwijdte uitgevoerd te worden. Indien hieruit blijkt dat bepaalde resultaten onbetrouwbaar zijn mogen deze niet gerapporteerd worden en dient een nieuwe bemonstering te worden uitgevoerd van de geteste waters. Indien van toepassing dient ook de impact op eerder gerapporteerde resultaten te worden nagegaan.

## 8.6 RAPPORTAGE

Het testrapport bevat:

- De identificatie van het monster afvalwater: gegevens over monsternamen, datums van testuitvoering respectievelijk Zahn-Wellens behandeling of toxiciteitevaluatie, resultaten van meting van de randvoorwaarden en DOC-meting.

---

vaststelling van toxiciteit in de controle test met de referentiestof, hetgeen een goede afbraak en toxiciteit eliminatie op 7 dagen in de weg staat, maar verbeterd kan worden door de behandeling tot 28 dagen te verlengen.

- Identificatie van het actief slib: gegevens over monstername, voorbehandeling en bewaring, en bepaling van droge stofgehalte.
- Verwijzing naar de betreffende WAC-methodes (Zahn-Wellens, DOC-analyse, fysicochemische parameters en meting ecotoxiciteit).
- Resultaten:
  - Testcondities
  - DOC-resultaten, grafische voorstelling i.f.v. de tijd.
  - Berekende bioeliminatie rendement per conditie en tijdstip (7 d, eventueel 28 d in tabel), en grafische voorstelling voor alle tijdstippen.
  - Resultaat toxiciteitmeting(en) als % effect voor hetzij 7 d, hetzij 28 d behandeling (optioneel voor beiden).
- Opmerkingen en afwijkingen.

## 9 REFERENTIES

- OECD guidelines for testing chemicals N° 302b (1992): Inherent biodegradability: Zahn Wellens/EMPA test
- ISO 5665-15 (2009). Water quality — Sampling —Part 15: Guidance on the preservation and handling of sludge and sediment samples.
- ISO 9888 (1999). Water Quality – Evaluation of ultimate aerobic biodegradability of organic compounds in aqueous medium – Static test (Zahn-Wellens method).
- Gartiser S., Hafner C., Hercher C., Kronenberger-Schäfer K. & A. Paschke (2010). Whole effluent assessment of industrial wastewater for determination of bat compliance. Part 1: paper manufacturing industry. Environ. Sci. Pollut. Res. 17: 856-865.