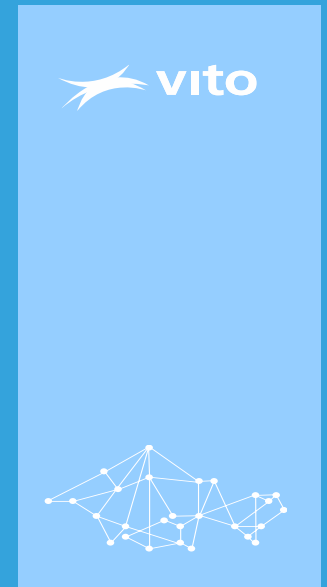
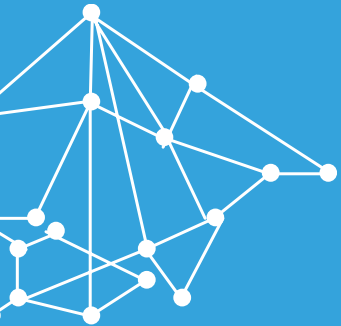


Totaal effluent beoordeling TEB - hoe lees je een ecotoxiciteitsverslag?

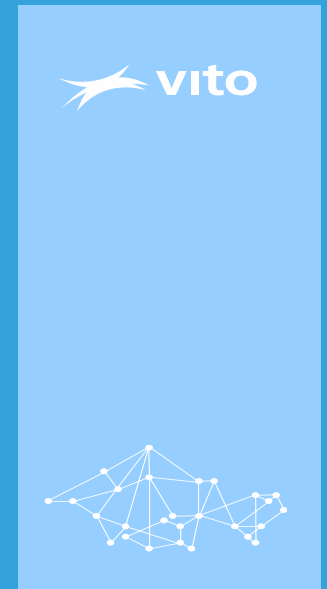
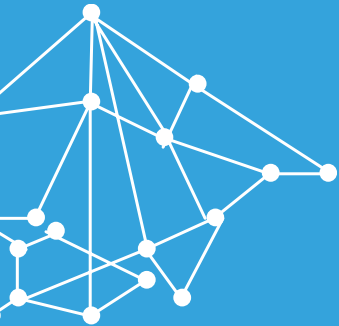
Reinhilde Weltens - VITO



Infosessie 20/09/2016

inhoud

- » Testen voor TEB
- » Het verslag:
 - » Doel van de studie
 - » Informatie over het monster
 - » Methodebeschrijvingen
 - » Resultaten
 - » Conclusies



TESTEN VOOR TEB

De testprotocols staan beschreven in het Watercompendium

<http://emis.vito.be/nl/lne-erkenningen-water>

» Microtox

» Algen

» Daphnia

» Vis

» Vislarven



Beschrijven van het doel van de studie

- » De acute toxiciteit werd onderzocht voor 1 effluentstaal van XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX en getoetst aan het Vlaamse toetsingskader.
- »
- » De volgende acute ecotoxiciteitstesten werden uitgevoerd:
 - » overlevingstest met forel (*Oncorhynchus mykiss*)
 - » overlevingstest met watervlo (*Daphnia magna*)
 - » groei-inhibitietest op eencellige algen (*Pseudokirchneriella subcapitata*)
 - » Microtox® test (*Vibrio fisherie*).

INFORMATIE OVER HET MONSTER

- » Datum staalname
- » Wie heeft het monster genomen/geleverd
- » Hoe werd het monster bewaard

Testmateriaal

Staal aangeleverd door xxxxx op 13/02/2016.

Code:

Tabel 1: staalcode

etiket	Staalcode
Effluent xxxxx	16B011

Het afvalwater werd in de koelkast bewaard tot gebruik.

 vito



METHODEBESCHRIJVING

Fysicochemische metingen: welke metingen? Waarmee? Specifieke methoden indien van toepassing

- » **Fysicochemische metingen**
- » Vis O₂ meter xxx
 pH en temperatuur: xxxx (draagbare pH meter)
 conductiviteit: xxxxx
- » Alg pH meter xxxxx
- » Daphnia pH meter xxxxx
- » Conductiviteit xxxxx
- » O₂meter xxxxxx
- »
- » Fysicochemie monster:
- » Conductiviteit (S/cm): xxxxx
- » Hardheid: Hach Lange Kit LCK327 10.2010 (toestel CADAS 1 L-SFM-001)
- » Chloride (mg/l): Hach Lange kit LCK 311 (toestel CADAS 1 L-SFM-001)
- » Ammonium (mg/l): Hach Lange kit LCK 304(toestel CADAS 1 L-SFM-001)



BIOLOGISCHE TESTMETHODEN

KITS MicroBioTest

- » Er worden in de meeste labo's kits gebruikt voor de microtox, algen en daphniatesten (en voor de zoutwateralternatieven).
- » Te vermelden: naam, species testorganisme, ISO norm/WAC procedure
- » Batch van de gebruikte KIT
- » Testspecifieke informatie



METHODEBESCHRIJVINGEN

Testspecifieke informatie

- » Datum van uitvoering (in principe max.72u na staalname voor verse monsters)
- » Testcode
- » Beschrijving van de testcondities: temperatuur, licht/donker ritme,..
- » Monsterbehandeling (bv. pH aangepast, belucht, gefilterd,..)
- » Testconcentraties
- » Verdunningswater
- » Testprotocol: aantal organismen, aantal replica's, duur van de blootstelling, tussentijdse waarnemingen, metingen (bv. pH, zuurstof, fluorescentie (algen), mobiliteit (daphnia), sterfte (vis)...).
- » Kwaliteitscriteria waaraan voldaan moet worden:
- » Berekeningen

METHODEBESCHRIJVING

Testspecifieke informatie

Algen groei-inhibitietest – gebaseerd op OECD 201 en WAC/V/B/003.

Conditie:

- Erlenmeyers (inhoud 500 ml) voorzien van luchtdoorlatende stop
- Inhoud: 95 ml waterstaal of water (controle), 5 ml geconcentreerd OECD medium (20x), 100 µl algenstock (batch 2003/03 *Pseudokirchneriella subcapitata* – $10.48 \cdot 10^6$ cellen per ml)
- 3 replica's voor testcondities en abiotische controles, 6 replica's voor controle
- de testen werden uitgevoerd in incubator BIO 0765: 23°C, continue belichting (4490 lux), toerental 100 rpm
- Testconcentraties: 95 - 47.5 - 23.72 - 11.86 - 5.93 % (95% van 100-50-25-12.5-6.25% afvalwater)
- Blootstellingsduur 72 h

Metingen:

- pH bij begin en eind
- Startmeting van het aantal cellen met coulter counter/fluoroskan, dagelijkse meting met Fluoroskan.

Berekeningen:

- Toename in biomassa in functie van de tijd (groei-curven), specifieke groei, groeisnelheid.
- EC_{50} voor groeisnelheid en biomassa worden berekend via lineaire interpolatie.

Validatiecriteria:

- minimaal 16x toename van de biomassa in de controle,
- variantiecoëfficiënt < 7% voor de specifieke groei in de controlereplica's.

De eerste test werd uitgevoerd van 16 -19/02/2015: deze test voldeed niet aan de validatiecriteria en werd herhaald van 24-27/02/2015.

Testcode: ALGE150xxx-herhaling

METHODEBESCHRIJVING

verdunningswater

- » Indien geen kit: verdunningswater specificeren (bv. JP4, OECD...of samenstelling geven)

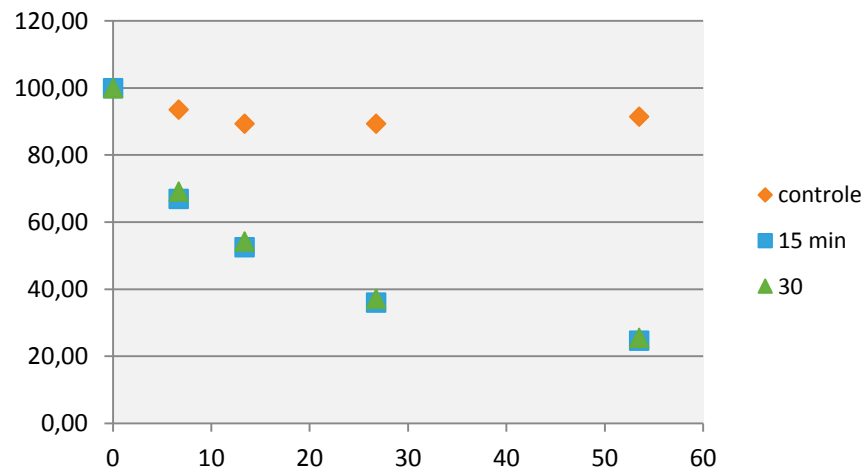
component	mg/l
H ₃ BO ₃	0,185
MgSO ₄ ·7H ₂ O	7,4
ZnCl ₂	0,003
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0,08
CaCl ₂ ·2H ₂ O	18
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,0015
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0,00001
NH ₄ Cl	15
MgCl ₂ ·6H ₂ O	12
MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,415
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,0037
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	0,1
KH ₂ PO ₄	1,6
NaHCO ₃	50



METHODEBESCHRIJVING

Berekening/bepaling van het effect per biotest

- » Microtox: testorganisme *Vibro fischeri* is een bacterie die spontaan licht geeft (autobioluminescentie): toxische stoffen veroorzaken storingen in het metabolisme en daardoor een versnelde afname van de lichtsterkte in functie van de tijd. De afname wordt vergeleken met de normale afname in de controles en uitgedrukt in procent inhibitie ten opzichte van de controles. EC50 is de concentratie die 50% effect veroorzaakt. Voor de berekeningen is een standaard microtox softwarepakket beschikbaar.



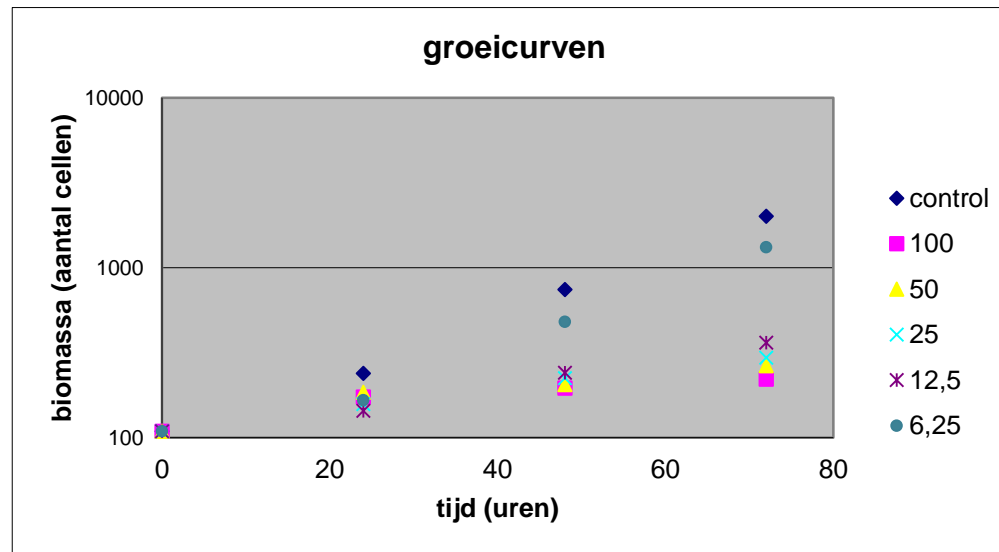
vito



METHODEBESCHRIJVING

Berekening/bepaling van het effect per biotest

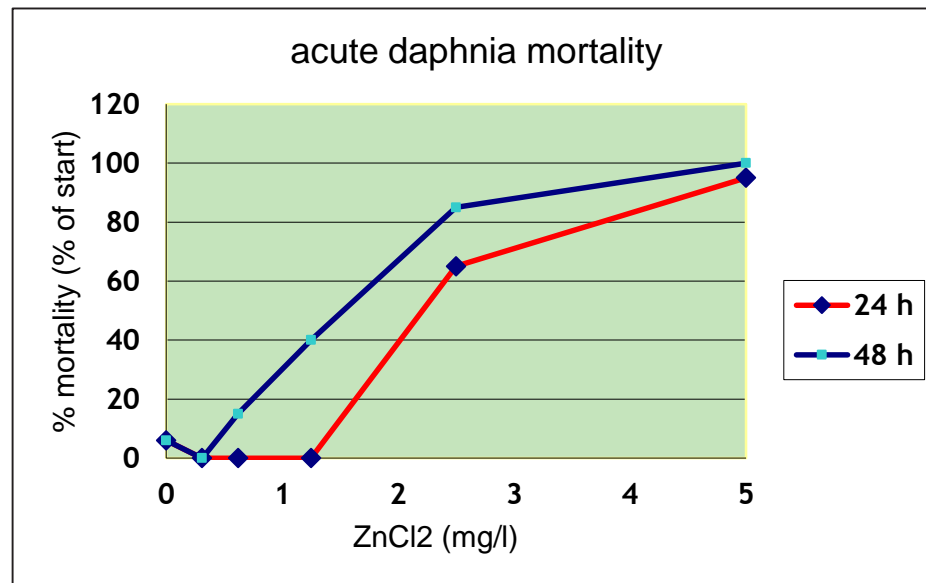
- » Algen: de eencellige algen groeien exponentieel in controle-omstandigheden. Toxische stoffen inhiberen de normale groei. De specifieke groeisnelheid μ wordt berekend voor elke testconcentratie $(\ln B_n - \ln B_0) / (t_n - t_0)$. De vermindering in groeisnelheid wordt procentueel uitgedrukt ten opzichte van de controles. EC50 is de concentratie die 50% effect veroorzaakt.



METHODEBESCHRIJVING

Berekening/bepaling van het effect per biotest

- » Watervlooien: toxische stoffen inhiberen de beweeglijkheid van de watervlooien. Het aantal organismen dat door de blootstelling immobiel wordt of sterft wordt procentueel uitgedrukt ten opzichte van het beginaantal. EC50 is de concentratie die 50% effect veroorzaakt.

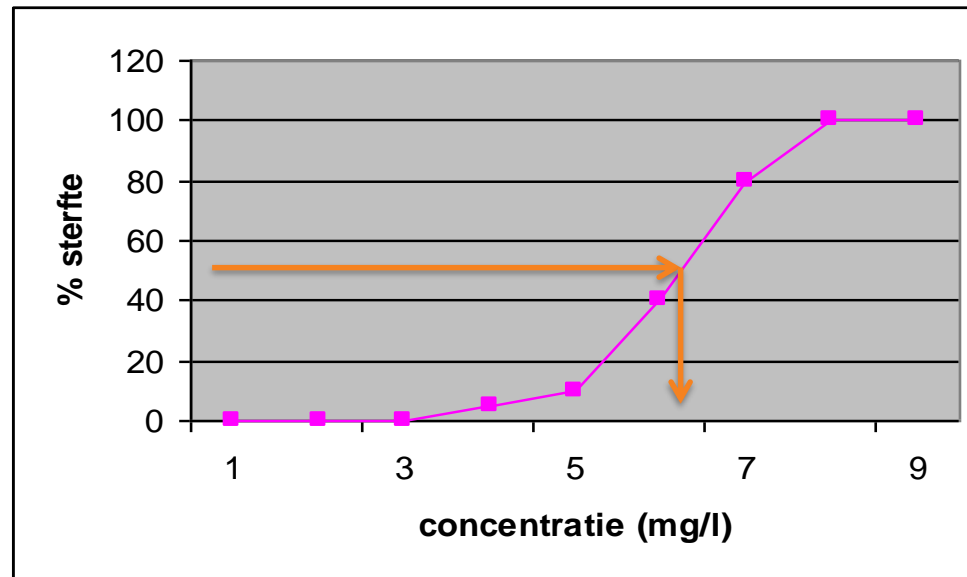


METHODEBESCHRIJVING

Berekeningen en interpretatie

Klassieke testen:





- » Concentratie-effectcurve: EC50 via lineaire interpolatie of gespecificeerde statistische methode



$$EC50 \rightarrow TU = 100/EC50$$

METHODEBESCHRIJVING

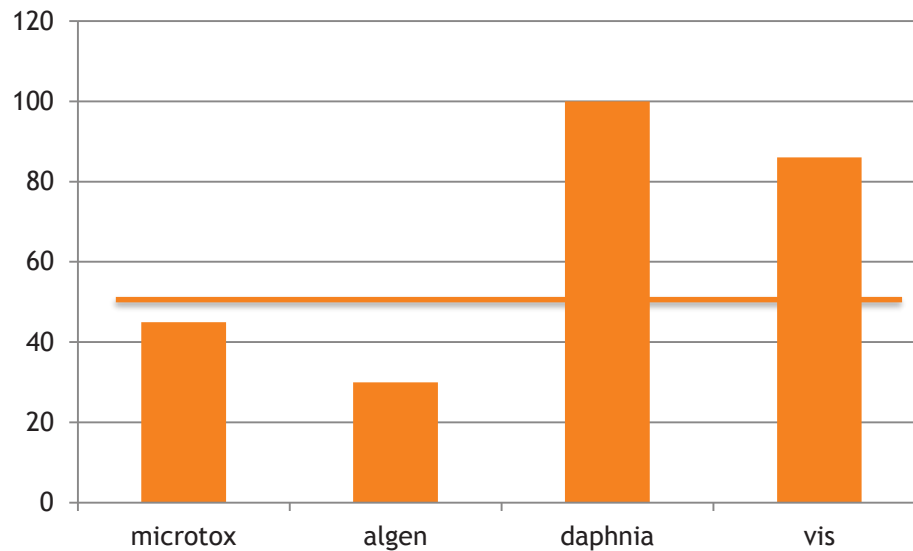
Interpretatie van de resultaten: klassieke testen

Criteria voor toxiciteit in conventionele testen		Classificatie van afvalwaters			
EC ₅₀ /LC ₅₀ (effluentconc.)	Toxische eenheden	> respons van gevoeligste organisme		> cumulative effect score (algen + watervlo + vis)	
		> 100% or > 90%	< 1 of < 1.1	geen acute toxiciteit	
10 - 100%	1 - 10	lage acute toxiciteit			
1 - 10 %	10 - 100	acute toxiciteit		3	
< 1%	> 100	hoge acute toxiciteit		5	

METHODEBESCHRIJVING

Interpretatie van de resultaten

- » Limiettesten: Enkel 100% afvalwater (of “zo hoog mogelijk”) testen



≥50% effect in
één van de 4
testen = code
rood

 vito



RESULTATEN:



biotesten

Voor elke test

- A. Zijn er overschrijdingen van de randvoorwaarden
- B. is aan de kwaliteitscriteria voldaan?
- C. de concentratie-effect curve of overzichtstabel
- D. de interpretatie (rekening houdend met de randvoorwaarden)
- E. de ruwe gegevens



RESULTATEN: VOORBEELD MICROTOX

microtox

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	gemeten	OK/nOK
pH	6.0 - 9.0	6.6	OK
Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)*	<46000	9740	OK
Zuurstof (mg/l)	>3	5.38	OK
Chloride-Cl (mg/l)*	>20000	2050	OK



Geen behandeling nodig
hoogste testconcentratie =
100%

RESULTATEN: VOORBEELD MICROTOX

microtox

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	gemeten	OK/nOK
pH	6.0 - 9.0	6.6	OK
Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)*	<46000	9740	OK
Zuurstof (mg/l)	>3	5.38	OK
Chloride-Cl (mg/l)*	>20000	2050	OK



Geen behandeling nodig
hoogste testconcentratie =
100%

2. Kwaliteitscontrole: fenoltest

	Voorwaarde (mg/l)	Resultaat (mg/l)	OK/nOK
stdfenol	$13 > x < 26$	18	OK



Testorganismen OK

 vito



RESULTATEN: VOORBEELD MICROTOX

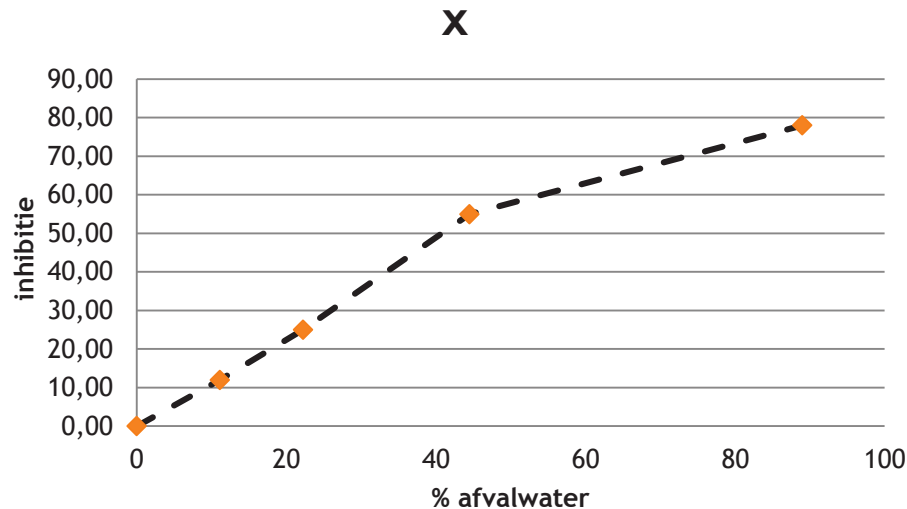
Inhibitie van de bioluminescentie

3. Testresultaten en interpretatie

» EC50= 41 %



Klassieke beoordeling: EC50 =41 % afvalwater
TU = 100/41 = 2,45
=> Code geel (lage acute toxiciteit)



RESULTATEN: VOORBEELD MICROTOX

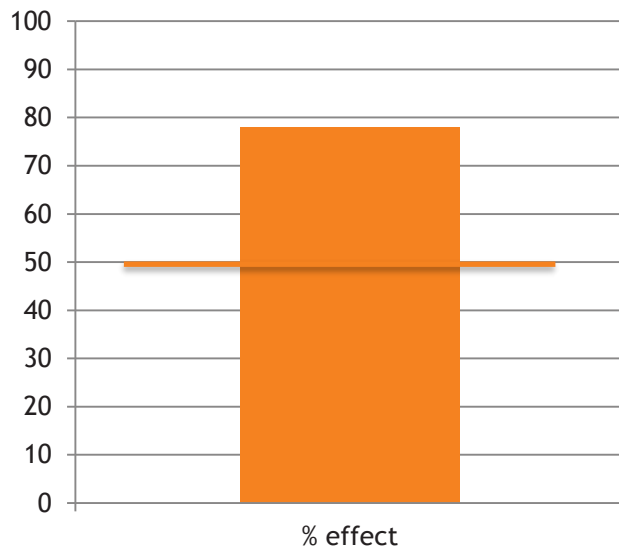
Inhibitie van de bioluminescentie

3. Testresultaten en interpretatie

» Effect



Nieuwe beoordeling: 78% effect = code rood

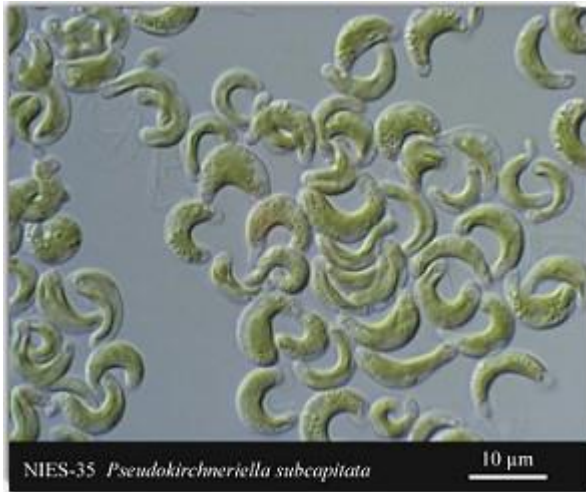


 vito



RESULTATEN: VOORBEELD ALGEN

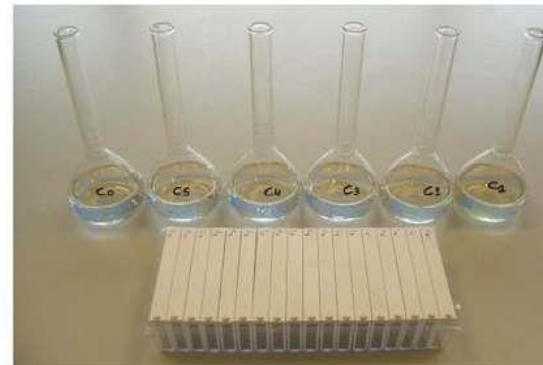
Algen inhibitie van de groeisnelheid



Testorganisme: *Pseudokirchneriella subcapitata* (10000 cellen per ml bij de start)

Testduur: 72h

Meting: aantal cellen



34

TRANSFER OF THE
ALGAE-TOXICANT
DILUTIONS INTO
THE TEST VIALS



vito



RESULTATEN: VOORBEELD ALGEN

Algen inhibitie van de groeisnelheid

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	x	OK/nOK
pH	7.0 - 9.0	6.6	nOK*
Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	<4000	9740	nOK*
Hardheid (mgCaCO_3/l)	<1000	1500	nOK*
Chloride-Cl (mg/l)	<1300	2050	nOK*
Ammonium-N (mg/l)	<25	56	nOK*



De conductiviteit en chloriden zijn te hoog: hoogste testconcentratie = 50%

RESULTATEN: VOORBEELD ALGEN

Algen inhibitie van de groeisnelheid

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	x	OK/nOK
pH	7.0 - 9.0	6.6	nOK*
Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	<4000	9740	nOK*
Hardheid (mgCaCO_3/l)	<1000	1500	nOK*
Chloride-Cl (mg/l)	<1300	2050	nOK*
Ammonium-N (mg/l)	<25	56	nOK*

De conductiviteit en chloriden zijn te hoog: hoogste testconcentratie = 50%

2. Kwaliteitscontrole

Testconcentraties (%)	Controle	100
bij aanvang test	10000	10000
na 72h	775697	10000
Toenamefactor	77	

OK, meer dan 16x toegenomen
=> organismen OK

RESULTATEN: VOORBEELD ALGEN

	specifieke groeisnelheid (μ)			0-72 h			
dag	100	50	25	12,5	6,25	0	
3 - x1	0,21	0,30	0,33	0,39	0,84	0,9627	
3 - x2	0,26	0,29	0,34	0,38	0,82	0,9598	
3 - x3	0,24	0,30	0,33	0,43	0,83	0,9528	
3 - x4						1,0156	
3 - x5						0,9713	
3 - x6						0,9598	
3 - mean	0,235	0,297	0,332	0,400	0,831	0,970	
SD						0,023	
%VC						2,367	< 7%
% inhibitie							
dag	100	50	25	12,5	6,25	0	
3 - x1	78,74	69,04	66,42	59,57	13,27	0,79	
3 - x2	73,40	70,15	65,18	60,62	15,37	1,09	
3 - x3	75,31	69,04	65,67	56,03	14,42	1,81	
3 - x4						-4,66	
3 - x5						-0,10	
3 - x6						1,09	
3 - mean	75,8	69,4	65,8	58,7	14,4	0,0	
3 - SD	2,7	0,6	0,6	2,4	1,1	2,4	



RESULTATEN: VOORBEELD ALGEN

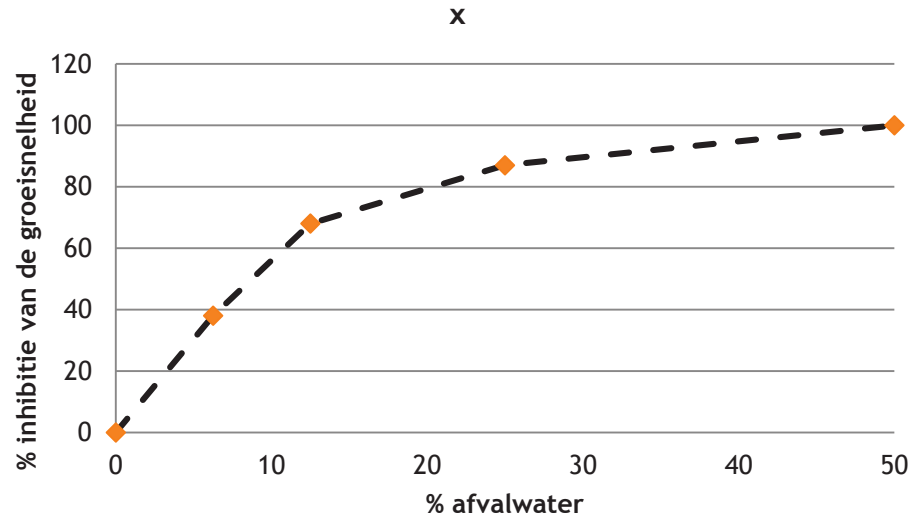
Inhibitie van de groeisnelheid

3. Testresultaten

» EC50= 14 %



Klassieke beoordeling: EC50 = 11% afvalwater
TU = 100/11 = 9
Code geel (lage acute toxiciteit)

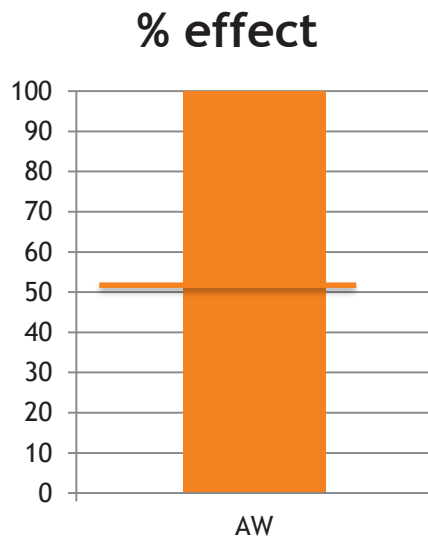


VOORBEELD ALGEN

Inhibitie van de groeisnelheid

» 100 % effect in de hoogste concentratie →

Nieuwe beoordeling: effect \geq 50%
Code rood (acuut toxisch)



VOORBEELD DAPHNIA

Daphnia immobiliteit



Testorganisme: *Daphnia magna*

Testduur: 48 uur

Meting: immobiliteit (= sterfte)



The *Daphnia* are observed for 48 hours. They begin dying.
The less dilute the waste, the higher the percentage of dead organisms.



STEP 5: Analyze the Data



VOORBEELD DAPHNIA

Daphnia immobiliteit

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	x	OK/nOK
pH	5.0 - 9.0	6.6	OK
Geleidbaarheid ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	<7500	9740	nOK*
Zuurstof (mg/l)	>3.0	5.38	OK
Chloride-Cl (mg/l)	<1300	2050	nOK*
Ammonium-N (mg/l)	<54	56	nOK*



De conductiviteit en chloriden zijn te hoog:
hoogste testconcentratie = 50%

2. Kwaliteitscontrole

0 % mortaliteit in de controles

Zuurstofgehalte > 60%



OK => organismen OK

 vito



VOORBEELD DAPHNIA

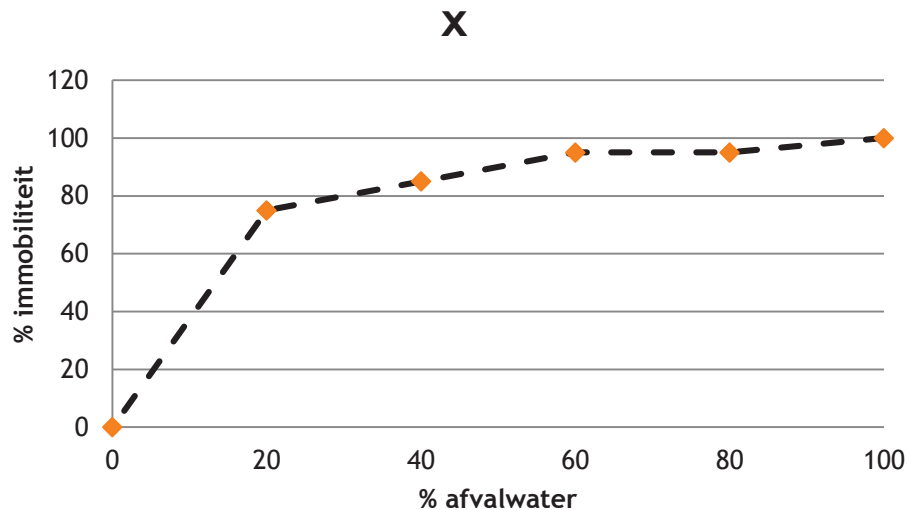
Daphnia immobiliteit

3. Testresultaten

» EC50= 17 %



Klassieke beoordeling: EC50 =17% afvalwater
TU = 100/17 = 5,9
Code geel (lage acute toxiciteit)

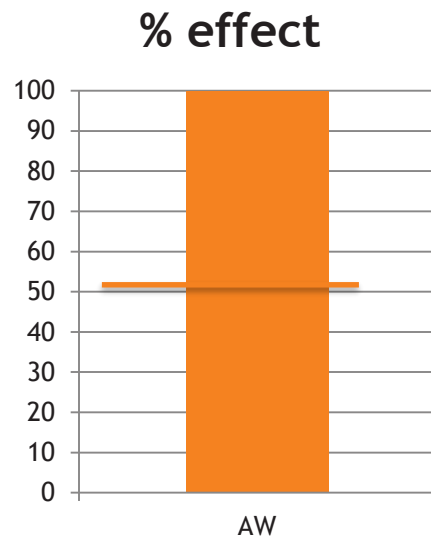


VOORBEELD DAPHNIA

Daphnia immobiliteit

» 100 % effect in de hoogste concentratie →

**Nieuwe beoordeling: effect \geq 50%
Code rood (acuut toxisch)**

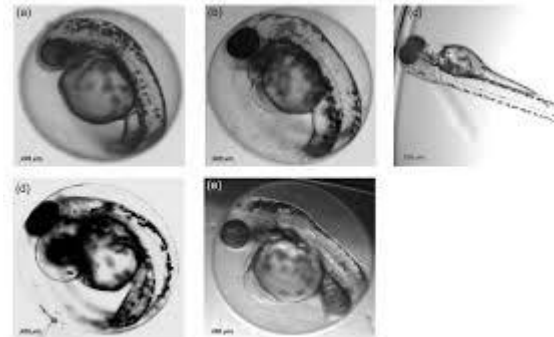


VOORBEELD VIS



Klassieke test
Testorganisme: juveniele forel
(*Onchorynchus mykiss*)
Testduur: 96 uur
Meting: sterfte

Nieuwe test
Testorganisme: eitjes van de
zebravis (*Danio rerio*)
Testduur: 96 uur
Meting: ontwikkeling, uit het ei
komen en sterfte



VOORBEELD VIS

Vis: sterfte

1. Randvoorwaarden toetsen

	Voorwaarde	x	OK/nOK
pH	6.0 - 9.0	6,6	OK
conductiviteit	<22 mS/cm	9,7	OK
Hardheid	10 - 3000 mg/l	1500	OK



De condities zijn OK:
hoogste testconcentratie =
100%

2. Kwaliteitscontrole

0 % mortaliteit in de controles

Zuurstofgehalte > 60%



OK => organismen OK

 vito

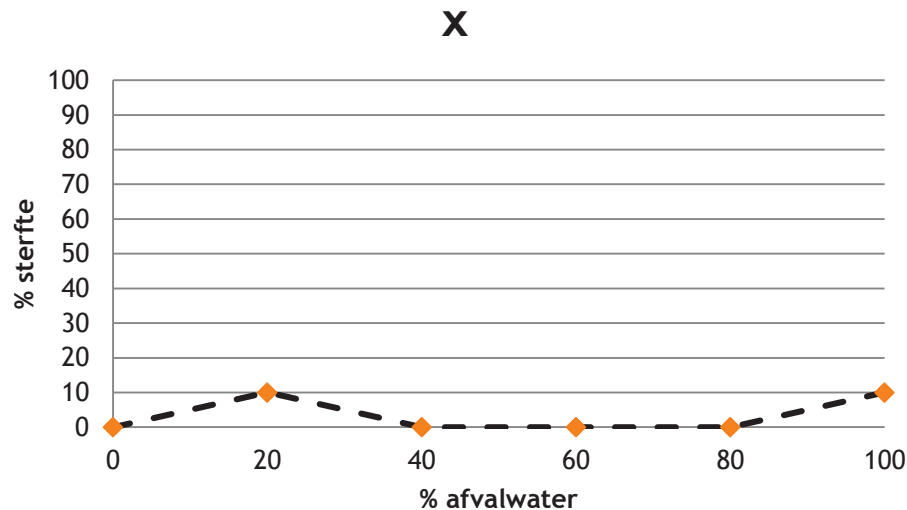


Vis: sterfte

3. Testresultaten

» EC50 > 100 % 

Klassieke beoordeling: EC50 > 100 % afvalwater
TU < 1
Code blauw (geen acute toxiciteit)



SAMENVATTING EN INTERPRETATIES

De testprotocols staan beschreven in het Watercompendium

<http://emis.vito.be/nl/lne-erkenningen-water>

	EC50 (% afvalwater)	TU (100/EC50)
microtox	41	2,45
algen	14	9
Daphnia	17	5,9
vis	>100	<1
Totaal		Code GEEL

Algen zijn het meest gevoelig ->
volgende kwartalen met algen testen

 vito



SAMENVATTING EN INTERPRETATIES

De testprotocols staan beschreven in het Watercompendium

<http://emis.vito.be/nl/lne-erkenningen-water>

	% effect in de hoogste testconcentratie
microtox	78
algen	100
Daphnia	100
vislarven	0
Totaal	rood

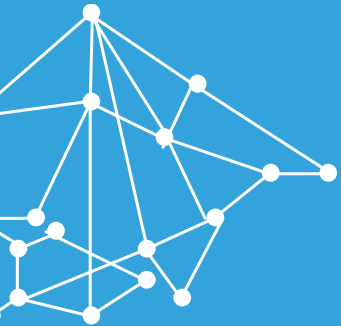
Microtox, algen en daphnia hebben score rood -> volgende kwartalen met elk van deze 3 organismen testen

 vito



Zahn Wellens

- » Afvalwater dat ecotoxisch is, maar geloosd wordt op een RWZI, is geen gevaar voor het milieu indien de toxische stoffen door de biologische zuivering worden afgebroken. Vandaar dat het nuttig is voor rioolozers om aan te tonen dat het RWZI (eventueel geadapteerd aan de specifieke lozings situatie) de toxiciteit voldoende verwijdert!



Toxiciteit = gevolg van

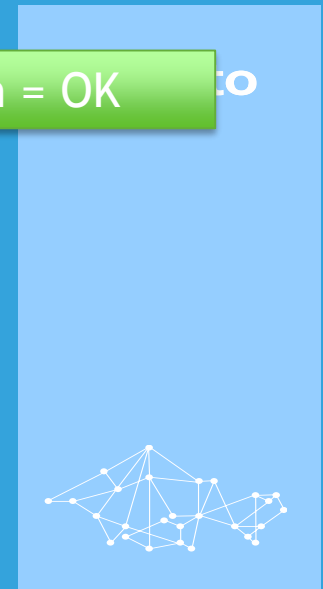
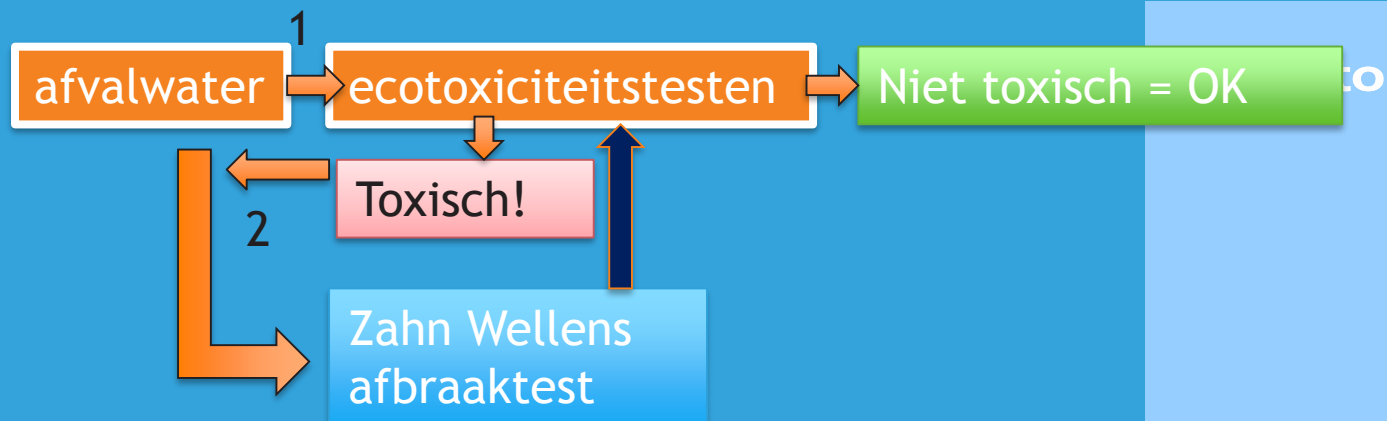
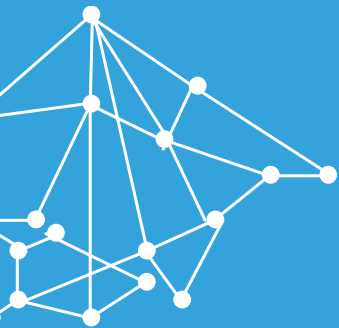
- a) Anorganische stoffen
- b) Organische persistente stoffen
- c) Organische, biologisch afbreekbare stoffen (ultiem afbreekbaar tot het niet toxische CO₂ of partieel afbreekbaar tot (niet- of wel-toxische) intermediären)**

vito



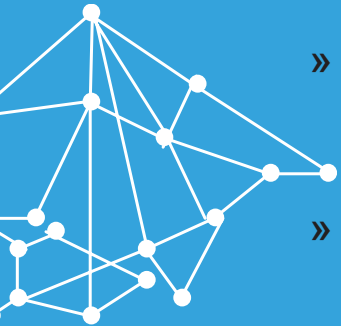
Zahn Wellens

- » Het doel is om de **afbraak/verwijdering van de toxiciteit** van een afvalwater in een zuiveringsinstallatie na te bootsen.
- » De hier beschreven methode wordt gebruikt om de biologische *snelle* afbreekbaarheid van de toxiciteit van een organisch gecontamineerd afvalwaterstaal in een (specifieke) RWZI in te schatten.



Principe

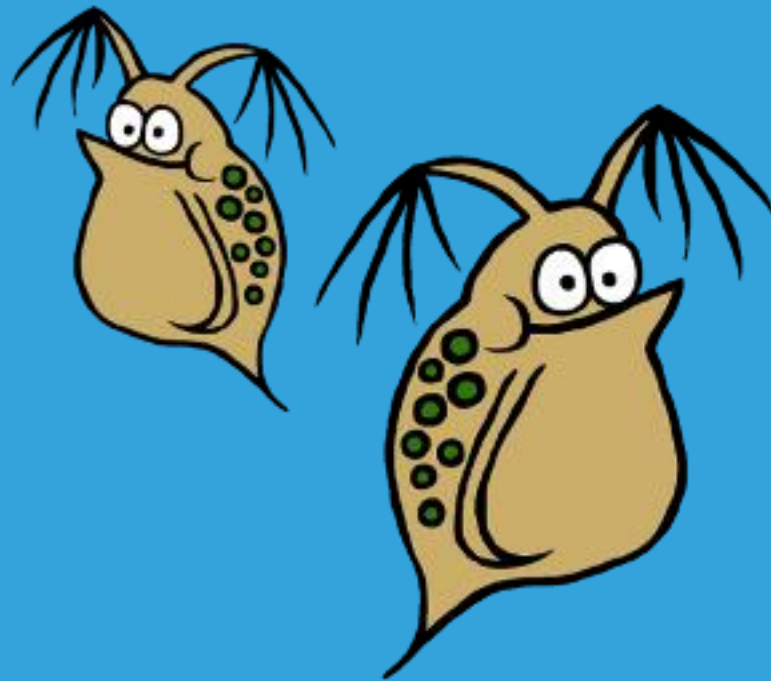
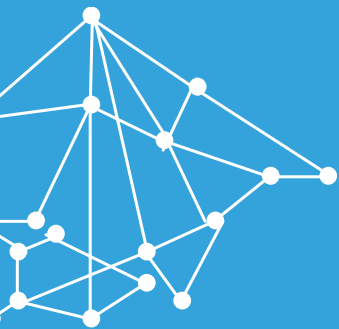
- » De 7-dagen Zahn-Wellens test simuleert de verwijdering door adsorptie en biodegradatie van een afvalwater wanneer dat geloosd wordt op een RWZI. Actief slib -afkomstig van het RWZI waarop het te testen afvalwater geloosd wordt - wordt met een concentratie van 1 g/l droge stof toegevoegd aan (bij voorkeur 80-100%) afvalwater. **Indien deze concentratie toxisch is voor het inoculum kan een lagere concentratie worden gebruikt.**



- » De biodegradatie wordt gedurende 7 dagen regelmatig opgevolgd door de meting van DOC (Dissolved Organic Carbon).
- » De afbraak van de toxische componenten wordt gemeten door de toxiciteit van het effluent na deze afbraaktest te meten.



» Dank voor uw aandacht



Infosessie 20/09/2016

 vito

