

1996-25\_indicatieve-analytische-methoden-  
correlatieanalyse


**stowa**

**Indicatieve analytische methoden en  
groeps- en somparameters voor de  
bepaling van waterkwaliteit**

Inventarisatie van bestaande technieken en correlatie-  
analyse van waterkwaliteitsgegevens

96-25

## Indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van waterkwaliteit



Inventarisatie van bestaande technieken en correlatie-  
analyse van waterkwaliteitsgegevens

96-25

Publikaties en het publikatieoverzicht  
van de Stowa kunt u uitsluitend  
bestellen bij:  
Hageman Verpakkers BV  
Postbus 281  
2700 AC Zoetermeer  
tel. 079-3611188  
fax. 079-3613927  
o.v.v. ISBN- of bestelnummer en  
een duidelijk afleveradres.  
ISBN 90. 74476.62.7

## INHOUDSOPGAVE

### Ten geleide

<b>1</b>	<b>INLEIDING</b> .....	<b>1</b>
1.1	Doelstellingen .....	1
1.2	Toelichting op de doelstellingen .....	1
1.3	Algemene projectinformatie .....	2
1.4	Rapportage .....	4
<b>2</b>	<b>INDICATIEVE ANALYTISCHE METHODEN VOOR DE BEPALING VAN WATERKWALITEIT</b> .....	<b>5</b>
2.1	Bioassays .....	5
2.2	Immunoassays .....	7
2.3	Enzymassays .....	9
2.4	Chemische sensoren .....	11
2.5	Flow Injectie Analyse (FIA) .....	13
<b>3</b>	<b>GROEPS- EN SOMPARAMETERS</b> .....	<b>15</b>
3.1	Inleiding .....	15
3.2	Totaal-organo 'element' bepaling .....	15
3.3	Totaal-organotin bepaling (OSN/AAS) .....	16
3.4	Organische microverontreinigingen (HPLC/UV-fingerprints) .....	16
3.5	Elementspecifieke organische microverontreinigingen (GC/AED-fingerprints) .....	16
3.6	Concluderend overzicht van de resultaten .....	16
<b>4</b>	<b>EXTRACTIE EN PRECONCENTRERING</b> .....	<b>19</b>
<b>5</b>	<b>STATISTISCHE ANALYSE VAN WATERKWALITEITSGEGEVENS</b> .....	<b>21</b>
5.1	Inleiding .....	21
5.2	Werkwijze .....	21
5.3	Resultaten .....	23
5.4	Conclusies .....	25
<b>6</b>	<b>ALGEMENE CONCLUSIES</b> .....	<b>27</b>
6.1	Indicatieve analytische methoden .....	27
6.2	Groeps- en somparameters .....	27
6.3	Statistische analyse waterkwaliteitsgegevens .....	28
6.4	Selectie van methoden voor tweede fase vervolgonderzoek .....	28

<b>7</b>	<b>MOGELIJKHEDEN VOOR FASE 2</b> .....	<b>31</b>
7.1	Inleiding .....	31
7.2	Detectie van organofosforbestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater met behulp van acute toxiciteitstesten met kreeftachtigen .....	31
7.3	Detectie van herbiciden en cyclodiënen in oppervlaktewater met behulp van immunoassays .....	32
7.4	Screening van 'PLRP-s' extraheerbare apolaire tot polaire verbindingen in oppervlaktewater met behulp van HPLC in combinatie met UV of DAD detectie ...	33
7.5	Conclusie .....	33
 <b>Referenties</b> .....		<b>35</b>
 <b>Afkortingen</b> .....		<b>43</b>
 <b>Tabel I</b> .....		<b>45</b>
<b>Bijlage 1</b>	<b>Bioassays</b> .....	<b>47</b>
<b>Bijlage 2</b>	<b>Immunoassays (als indicatieve methode voor de detectie van pesticiden in water)</b> .....	<b>63</b>
<b>Bijlage 3</b>	<b>Enzymassays</b> .....	<b>71</b>
<b>Bijlage 4</b>	<b>Chemische sensortechnieken</b> .....	<b>75</b>
<b>Bijlage 5</b>	<b>Totaal-organo 'element' bepalingen</b> .....	<b>79</b>
<b>Bijlage 6</b>	<b>Totaal organotinverbindingen (OSN/AAS)</b> .....	<b>87</b>
<b>Bijlage 7</b>	<b>Organische microverontreinigingen (HPLC/UV-fingerprints)</b> .....	<b>89</b>
<b>Bijlage 8</b>	<b>Elementspecifieke organische microverontreinigingen (GC/AED-fingerprints)</b> .....	<b>95</b>
<b>Bijlage 9</b>	<b>Detectie van organofosforbestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater met behulp van acute toxiciteitstesten met kreeftachtigen</b> .....	<b>99</b>
<b>Bijlage 10</b>	<b>Detectie van herbiciden en cyclodiënen in oppervlaktewater met behulp van immunoassays</b> .....	<b>103</b>
<b>Bijlage 11</b>	<b>Bepaling van 'PLRP-s' extraheerbare apolaire tot polaire verbindingen in oppervlaktewater met behulp van HPLC in combinatie met UV of DAD detectie</b> .....	<b>111</b>

## TEN GELEIDE

In het waterbeheer zijn steeds vaker dure en gecompliceerde analysetechnieken noodzakelijk om te voldoen aan alle eisen. Vooral bij routinemetingen zou een indicatieve vooranalyse een belangrijke verbetering betekenen; daarmee kan een eerste scheiding worden aangebracht tussen "verdachte" en "onverdachte" monsters. Voor de laatste categorie kunnen de dure analyses dan wellicht achterwege blijven. Kansrijke indicatieve analysetechnieken zijn o.a. immuno-assaytechnieken, chemische indicatoren en selectieve bioassays. Daarnaast kan in bepaalde situaties mogelijk worden volstaan met de bepaling van groeps- en somparameters, dan wel met breed screenende technieken. Uitgangspunt voor de introductie van dergelijke technieken is het huidige en het toekomstige analysepakket van de waterbeheerders.

Om die reden heeft de de STOWA opdracht gegeven aan het International Centre of Water Studies (ICWS) in Amsterdam, om in samenwerking met AquaSense, Elti Support en KIWA een studie uit te voeren naar mogelijk geschikte indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters voor de bepaling van de waterkwaliteit. Het eerste product van deze studie is een inventarisatie van bestaande technieken en een correlatie-analyse van waterkwaliteitsgegevens.

Voor het vervolg van dit onderzoek is een validatie van de meest belovende methoden uit deze inventarisatie voorzien, alsmede een implementatie van deze technieken in de praktijk van het Nederlandse waterbeheer.

Het project is uitgevoerd door het International Centre of Water Studies (ICWS) met medewerking van Aquasense, Elti Support en KIWA. Het projectteam bestond uit dr. H.A.G. Niederländer (projectleider), ing. L. de Vree en prof. dr. J. Dogterom (ICWS), drs. J. Brils (AquaSense), mw. dr. P.M.M. Meulenberg (Elti Support) en dr. Th.H.M. Noij (KIWA).

Het project is begeleid door een door het bestuur van de STOWA ingestelde begeleidingscommissie bestaande uit drs. R. Masee (Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier) als voorzitter en dhr. H. van den Berg (Zuiveringschap West-Overijssel), dhr. B. Eshuis (Waterschap Regge & Dinkel), dr. S.P. Klapwijk (STOWA), dr. W.H. Mulder (RIZA), dhr. P.J. van der Wee (Hoogheemraadschap van Rijnland) en drs. D. de Zwart (RIVM) als leden.

Namens het bestuur van de STOWA, de uitvoerders en de begeleidingscommissie spreek ik de hoop uit dat deze studie zal bijdragen aan een vermindering of een mindere groei van de uitgaven aan analytisch-chemisch onderzoek in het Nederlandse waterbeheer.

Utrecht, oktober 1996

De directeur van de STOWA,

drs. J.F. Noorthoorn van der Kruijff

# 1 INLEIDING

## 1.1 Doelstellingen

In opdracht van de Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer (STOWA) en in het kader van het Stowa onderzoeksplan 1995-1999, heeft ICWS opdracht gekregen een bijdrage te leveren aan de inventarisatie, validatie en mogelijk implementatie van indicatieve analytische technieken en analytische technieken die een groeps- of somparameterresultaat opleveren. Dit is in twee hoofddoelstellingen te formuleren:

- A Selectie en evaluatie van de toepasbaarheid van (eenvoudige, snelle en goedkope) indicatieve (voor-) analysetechnieken die potentieel inzetbaar zijn voor routinematig door de waterbeheerders uit te voeren bepalingen.
- B Evaluatie van chemische groeps- en somparameters voor de bepaling of screening van organische microverontreinigingen in water en slib, en het operationeel maken en valideren van geselecteerde methode(n) en overdragen van deze methode(n) naar uitvoerende laboratoria.

Naast de hierboven beschreven inventarisaties is een statistische analyse van bestaande gegevensbestanden van enkele waterbeheerders uitgevoerd met het doel de mogelijkheden te inventariseren om het analysepakket van de waterbeheerders, zonder onaanvaardbaar informatieverlies, te verkleinen.

## 1.2 Toelichting op de doelstellingen

Chemische analysemethoden moeten aan hoge eisen voldoen om bruikbare resultaten te kunnen leveren. Zo wordt verwacht dat een methode robuust is, selectief de gezochte verbinding(en) aantoonst, de monster-matrix geen invloed heeft op de bepaling en dat de detectielimieten ruim beneden de AMK-normen liggen. Om aan deze voorwaarden te kunnen voldoen blijken steeds vaker dure en gecompliceerde analysemethoden, op basis van b.v. GC-MS en geavanceerde HPLC technieken, noodzakelijk te zijn. Dergelijke analysemethoden blijken bovendien vaak bijzonder tijdrovend te zijn. Daarnaast gebeurt het niet zelden dat dure analysemethoden gebruikt worden om uiteindelijk te constateren dat de gezochte verbinding niet aangetoond kan worden.

Vooraf ten behoeve van routine-metingen zou een indicatieve (voor-) analyse een belangrijke verbetering betekenen; daarmee zou een eerste scheiding worden aangebracht tussen 'verdachte' en 'onverdachte' monsters. Voor de laatste categorie kunnen de eerder genoemde dure analyses dan wellicht achterwege blijven. Kansrijke indicatieve analysetechnieken zijn onder andere immunoassaytechnieken, selectieve bioassays en enzymremmings-assays. Verder bieden ook sensor technieken (chemische - en biosensoren) in toenemende mate interessante mogelijkheden voor de milieu-analyse.

Verder kan, afhankelijk van het doel en de onderzoeksvraag, mogelijk voor een deel van de werkzaamheden worden volstaan met de bepaling van groeps- of somparameters, dan wel met breed screenende technieken. Aangezien ook dergelijke technieken veelal niet gericht zijn op het direct identificeren en kwantificeren van individuele verbindingen, kunnen ook

deze technieken worden aangemerkt als indicatieve analysemethoden, waarmee een meer algemeen beeld van waterkwaliteit wordt verkregen. Kansrijke nieuwe technieken zijn onder andere: totaalgehalte vluchtig organokoolstof (VOC), adsorbeerbaar organohalogenen (AOX), extraheerbaar organostikstof (EON), bepaling van organotin (na extractie) met AAS en multi-componentscreening met b.v. HPLC en UV of diode array detectie.

Voor de introductie van bovengenoemde technieken dient het huidige en te verwachten toekomstige analysepakket van de waterbeheerders als uitgangspunt genomen te worden. De te introduceren technieken moeten leiden tot een vermindering van de onderzoekskosten c.q. tot een mindere groei van de onderzoekskosten.

Om een beter beeld te kunnen krijgen van de analytische technieken die voor dit doel beschikbaar zijn en de toepassingsmogelijkheden die deze technieken bieden is echter inventarisatie-, validatie- en implementatie-onderzoek noodzakelijk.

In een aanvullende opdracht binnen fase 1 van dit project is ICWS verzocht databestanden van een aantal waterbeheerders statistisch te analyseren op het bestaan van correlaties tussen de gemeten chemische parameters (MILBOWA parameters en aanvullend gemeten bestrijdingsmiddelen). Het bestaan van dergelijke correlaties zou mogelijkheden kunnen bieden om het analysepakket van de waterbeheerders te verkleinen.

### 1.3 Algemene projectinformatie

ICWS voert dit project uit in samenwerking met een drietal partners; AquaSense, Elti-support en KIWA. In grote lijnen loopt het project langs twee sporen, overeenkomstig de beide in paragraaf 1.1 geformuleerde doelstellingen. Daarbij worden enerzijds de mogelijkheden van indicatieve analytische methoden onderzocht (ICWS, AquaSense, Elti-support) en anderzijds de mogelijkheden van groeps- en somparameters (ICWS, KIWA). Kruisbestuivingen en interacties tussen deze beide sporen zijn echter goed mogelijk.

Het project is verder onderverdeeld in drie fasen, welke als zelfstandig deelproject volgtijdelijk uitgevoerd worden. De resultaten van een vorige fase zijn daarbij bepalend voor de precieze inhoud, omvang en planning van de daaropvolgende fase. Gedurende fase 1 en een deel van fase 2 lopen de beide hierboven genoemde sporen qua tijdsplanning synchroon, om in de laatste fase elk tot eigen implementatieonderzoek te komen.

Hieronder wordt een korte omschrijving gegeven van de onderzoeksactiviteiten in elk van de drie fasen:

#### Fase Korte omschrijving

1. Bureaustudie: inventarisatie en evaluatie van de beschikbaarheid en de toepasbaarheid van nieuwe en bestaande indicatieve analysemethoden en de toepasbaarheid van chemische groeps- en somparameters; selectie van de meest kansrijke methoden; statistische analyse van waterkwaliteitsdata.
2. Validatie van de meest kansrijke en toepasbare indicatieve methoden voor groeps- en somparameters op basis van bestaande ervaringen gekoppeld aan een beperkt veldonderzoek; evaluatie in termen van analytische prestaties, alsmede kosten en tijdsaspecten.

3. Toepassing en evaluatie van de geselecteerde indicatieve methoden binnen een/enkele onderzoeksproject(en) bij de deelnemende waterbeheerders; implementatie van enkele methode(n) bij laboratoria van de waterbeheerders behoort in deze fase ook tot de mogelijkheden.

In de eindrapportage worden de bevindingen van zowel doelstelling A als B meegenomen.

Het onderhavige rapport is een rapportage van de resultaten van fase 1 van het project. Tijdens fase 1 werd een zo breed mogelijk scala aan potentieel bruikbare analytische methoden geïnterviewd. Zowel bestaande en beschreven methoden alsook nieuwe en nog niet (breed) toegepaste technieken werden bij het onderzoek betrokken. Daarbij werd o.a. aandacht besteed aan aspecten als:

1. zinvolheid van de technieken als screeningsmethode voor algemene, dan wel specifieke aspecten van de waterkwaliteit;
2. gevoeligheid van de methode voor de verbindingen waar deze betrekking op heeft;
3. kans op succesvolle toepassing door uitvoerende laboratoria (storingsgevoeligheid, bewerkelijkheid);
4. (commerciële) beschikbaarheid van apparatuur etc.;
5. kosten (apparatuur, verbruiksgoederen);

Gezien de beperkte tijd die beschikbaar was voor het uitvoeren van de inventarisatie, werden in individuele gevallen beperkingen gesteld voor wat betreft de te inventariseren methoden. Met name waar het de kosten betreft die verbonden zijn aan het uitvoeren van de verschillende methoden, kon gezien de veelheid aan geïnterviewde methoden slechts een indicatie gegeven worden.

#### **1.4 Rapportage**

De resultaten van de inventarisatie van indicatieve analytische methoden en groeps- en somparameters zijn beschreven in de hoofdstukken 2 t/m 4 en de bijlagen. De hoofdstukken 2 en 3 zijn samengesteld uit de concluderende overzichten van de resultaten die door de auteurs, op basis van eigen expertise, werden opgesteld. Daarbij wordt in hoofdstuk 2 aandacht besteed aan indicatieve analytische technieken. In hoofdstuk 3 worden methoden voor de bepaling van groeps- en somparameters besproken.

Hoofdstuk 4 heeft betrekking op extractie- en preconcentreringstechnieken. Dergelijke technieken zijn niet als zodanig geschikt voor analytische bepalingen. Zij vormen echter wel een belangrijke bijdrage waar het monstervoorbewerking betreft en leiden daarmee veelal tot een verbetering van de gevoeligheid en de herhaalbaarheid van een aantal in de hoofdstukken 3 en 4 besproken analytische technieken.

Hoofdstuk 5 beschrijft in het kort de werkwijze en resultaten van de statistische analyse van waterkwaliteitsdata.

In hoofdstuk 6 zijn de conclusies van de auteurs samengevoegd tot een algemene conclusie. Bovendien is in dit hoofdstuk het standpunt van de begeleidingscommissie opgenomen. Op basis daarvan worden ten slotte in hoofdstuk 7 de lijnen voor fase 2 van dit project gedefinieerd.





## 2 INDICATIEVE ANALYTISCHE METHODEN VOOR DE BEPALING VAN WATERKWALITEIT

### 2.1 Bioassays

#### 2.1.1 Inleiding

Ter afperking van de inventarisatie werden een aantal keuzen gemaakt. Bij deze inventarisatie werd uitsluitend uitgegaan van bestaande overzichten van bioassays. Naast literatuur en overzichten uit de AquaSense bibliotheek, werd daarbij gebruik gemaakt van literatuur die werd aangereikt vanuit de begeleidingscommissie en de partners in dit project, gegevens van leveranciers en/of ontwikkelaars van bioassays/microbiotesten en biosensoren en tips en gegevens van andere deskundigen.

Verder werden On-line zoekacties uitgevoerd in de ECHO (EU) bestanden Cordis en Eureka (zoekterm 'Toxic\*'), de STN-databestanden AquaScience, Biosis, LifeScience en PolluAbstracts (zoektermen: biosensor, (micro)biotest, (biological) indicator en bioindicator (vanaf 1993)), de STOWA 'Hydrotheek' (zoektermen: Biosensor, bioindicator, bioassay, biologische indicator).

Uit de, langs deze route, verworven informatie werd uitsluitend de informatie over bioassays/micro-biotesten verwerkt; d.w.z. dat biosensoren<sup>1</sup> vooralsnog buiten beschouwing werden gelaten. Ook testen gericht op detectie van mutageniteit en genotoxiciteit werden buiten beschouwing gelaten.

Aangezien het onderhavige project gericht is op de identificatie van analytische methoden die een snelle indicatieve screening van waterkwaliteit mogelijk maken, werden bovendien alleen bioassays met een testduur < 24 uur in het uiteindelijke overzicht opgenomen. Wel werden, naast reeds bestaande/toegepaste bioassays, tevens de allernieuwste technieken in de inventarisatie opgenomen.

Bij de inventarisatie van de gevoeligheden van bioassays werd getracht zoveel mogelijk bij de interessevelden van de waterbeheerders aan te sluiten, door het onderzoek te richten op die stoffen die daadwerkelijk in routinematige analyse door de waterkwaliteitsbeheerders worden meegenomen. Dit zijn (in elk geval) de M-lijst stoffen uit de Evaluatienota Water (ENW) aangevuld met enkele I-lijst stoffen, vnl. organofosfor bestrijdingsmiddelen. Gevoeligheden werden per bioassay, voor individuele verbindingen, in relatie gebracht met de ENW-grenswaarde voor water. Voor elk van de ENW (M- en I-lijst) stoffen werd de bioassay, met de beste gevoeligheid voor deze verbinding, in een overzicht opgenomen.

#### 2.1.2 Concluderend overzicht van de resultaten

In bijlage 1 (beschrijving bioassays) wordt een overzicht gegeven van de geïnventariseerde bioassays/microbiotesten. Daar wordt bovendien een overzicht gegeven van de wijze waarop de data verwerkt werden.

---

<sup>1</sup> Bioassay: toxiciteitstest waarin één soort testorganisme geheel wordt blootgesteld aan een (extract van een) water(bodem)monster uit het veld;

Biosensor: analytisch instrument waarin gebruik wordt gemaakt van delen van organismen en waarmee 'real time' en veelal continue een bepaald aspect van waterkwaliteit bepaald kan worden;

Microbiotest: geminiaturiseerde bioassay die relatief snel, eenvoudig en goedkoop kan worden uitgevoerd.

Tabel 1 Overzicht van aantallen geïnventariseerde bioassays/microbiotesten opgesplitst naar organisme.

organisme	alg	bacterie	eencellige (protozo)	raderdier	kreeftachtige	totaal aantal bioassays
aantal bioassays	1	16	1	3	8	29

Verreweg het grootste aantal geïnventariseerde bioassays/microbiotesten maakt gebruik van bacteriën en dan met name *Escherichia coli* en *Photobacterium phosphoreum* (zie bijlage 1 en tabel 1 hierboven). Ook wordt vaak gebruik gemaakt van kreeftachtigen (met name watervlooien).

Voor ongeveer de helft van het totaal aantal geselecteerde ENW-stoffen werden testresultaten (= resultaat van een bioassay) gevonden voor minimaal 1 bioassay (zie bijlage 1). Opvallend is dat voor de zware metalen verreweg de meeste testresultaten werden gevonden. Voor enkele bioassays werden voor een aantal metalen (Cd, Cr, Cu, Hg en Zn) testresultaten gevonden die lager waren dan de hoogste gevonden concentraties van deze stoffen door Hhs-RL en/of Hhs-US. In theorie lijkt het dus mogelijk om in een enkel geval met behulp van deze bioassays toxiciteit aan te tonen van de in het (oppervlakte)water aanwezige metaalverontreiniging.

De geïnventariseerde review-studies vermelden vaak alleen het resultaat voor toxiciteitsparameters zoals bijvoorbeeld EC50. Dit is de statistisch geschatte concentratie van de toxicant die 50% effect geeft (Effect Concentration). De detectielimiet (= laagste testconcentratie die een statistisch significant effect geeft in vergelijking met de controle) ligt lager dan deze EC50 waarde. Om de waarden voor deze detectielimieten (ook wel LOEC = Lowest Observed Effect Concentration genoemd) te achterhalen, dienen de basisstudies te worden geraadpleegd.

De Laser-Microbe Assay bleek dermate gevoelig dat voor Cd, Cu en Zn ook concentraties beneden de grenswaarde detecteerbaar zijn. De overige metalen en andere stoffen (PAK en bestrijdingsmiddelen) lijken pas detecteerbaar nadat het monster waarin deze zich bevinden wordt geconcentreerd. Te denken valt hierbij bijvoorbeeld aan concentrering m.b.v. XAD-hars (specifiek op organische stoffen) of andere concentreringstechnieken. Ook is het mogelijk om door bijstelling van bijvoorbeeld de pH de gevoeligheid van de bioassay te vergroten. De Toxi-Chromotest blijkt bijvoorbeeld bij pH 5.5 gevoeliger voor kwik dan bij pH 7.5 (zie bijlage 1, tabel 1.3). Voor PCB's werden geen testdata gevonden.

Opvallend is verder dat voor slechts een gering aantal bioassays randvoorwaarden beschikbaar zijn voor enkele fysische en chemische parameters die van invloed kunnen zijn bij het uitvoeren van de testen. Het gaat hier om randvoorwaarden voor de zogenaamde 'modifying factors' zoals zuurgraad, zuurstofgehalte, hardheid, etc. Dit soort gegevens is nodig om eventuele effecten te kunnen interpreteren.

Concluderend kan gesteld worden dat het met een aantal bioassays mogelijk lijkt te zijn om (eventueel na concentrering) toxiciteit aan te tonen van in het (oppervlakte)water aanwezige verontreinigingen. Dit geldt met name voor de zware metalen. In dat geval lijkt het dus ook

mogelijk om m.b.v. bioassays een scheiding aan te brengen tussen verdachte en onverdachte watermonsters.

## 2.2 Immunoassays

### 2.2.1 Inleiding

Op het gebied van de analyse van milieuverontreinigende stoffen is de immunoassay nog relatief nieuw. Dit ondanks de ervaringen in de klinische chemie, waar de immunoassay al sinds enkele decennia wordt beschouwd als een betrouwbare analysemethode voor de diagnostiek. Heel langzaam beginnen echter de voordelen van de immunoassay erkend te worden in de analytische chemie op het gebied van milieuverontreinigingen. Dat de immunoassay talloze mogelijkheden biedt, moge al blijken uit het enorme aantal publikaties over de ontwikkeling van immunoassays voor milieuverontreinigende stoffen en met name pesticiden. Een overzicht is gepubliceerd [Hunter en Corrie, 1983]. Ook is er reeds een aantal commercieel verkrijgbare immunoassaykits op de markt. Specifieke informatie, m.b.t. deze commercieel verkrijgbare immunoassays en het werkingsprincipe van immunoassays in het algemeen, is opgenomen in bijlage 2. Hieronder wordt een concluderend overzicht gegeven van de resultaten van de inventarisatie van immunoassays voor de bepaling van waterkwaliteitsparameters en te verwachten ontwikkelingen op dit gebied.

### 2.2.2 Concluderend overzicht van de resultaten

De immunoassay is door zijn gevoeligheid, selectiviteit, snelheid en kosteneffectiviteit uiterst geschikt voor toepassing als indicatieve methode in waterkwaliteitsonderzoek. Met name voor pesticiden is reeds een serie immunoassaykits commercieel verkrijgbaar die in meer of mindere mate specifiek zijn voor één verbinding of een groep verwante verbindingen. De immunoassay biedt het voordeel dat binnen zeer korte tijd meerdere monsters tegelijkertijd gescreend kunnen worden op bepaalde verontreinigingen. Bovendien is de gevoeligheid van de meeste kits dusdanig dat direct, zonder voorbereiding watermonsters geanalyseerd kunnen worden op het voor pesticiden geldende concentratieniveau van 0,1 µg/l (EU-norm). Vooral voor polaire verbindingen is dit een zeer gunstig kenmerk.

Bovendien zijn er immunoassays beschikbaar (of kunnen ontwikkeld worden) voor stoffen, die met de conventionele analysemethoden (nog) niet gemeten kunnen worden. De immunoassay zal vooralsnog een indicatieve methode zijn, maar wanneer de techniek als zodanig en afzonderlijke immunoassays op zich genormeerd zijn, zal deze als zelfstandige analysemethode op hetzelfde kwaliteitsniveau zitten als HPLC en GC.

Omdat de immunoassay in de milieu-analyse nog relatief nieuw is, zijn er tot nu toe nog weinig validatiestudies uitgevoerd. Deze zijn niet alleen nodig in het kader van de normering maar ook voor toepassingsdoeleinden. Naast de bepaling van kruisreactiviteiten zullen hierbij ook matrixeffecten bekeken moeten worden. De toepasbaarheid in bijvoorbeeld een early-warning programma is echter al aangetoond hetgeen aangeeft dat de immunoassay een veelbelovende techniek is in waterkwaliteitsonderzoek.

In het kader van validatiestudies, met name met het oog op toekomstige normering, zullen immunoassays geëvalueerd moeten worden op relevante parameters, waarbij aandacht geschonken moet worden aan praktijkmonsters waaraan al dan niet d.m.v. standaardadditie relevante verbindingen (i.e. 'mogelijk' kruisreagerende stoffen) zijn toegevoegd. Enkele

studies op dit gebied zijn reeds uitgevoerd [Meulenberg, 1992; Meulenberg, Stoks en Mulder, 1993; Beenackers, 1995; Meulenberg en Stoks, in press].

De gemeten analieten waren: aldicarb, atrazine, 2,4-D, isoproturon, fenylureumherbiciden en PAK. De kits waren afkomstig van Millipore, Baker, Ensys en Riedel-de Haën. Deze laatste firma is niet in het producentenoverzicht van bijlage 2 opgenomen, omdat zij uitsluitend een kit voor atrazine leveren. De algemene conclusies die uit deze onderzoeken getrokken kunnen worden zijn:

- de assays zijn gemakkelijk uit te voeren;
- per kit kunnen tot ongeveer 40 monsters in duplo gemeten worden;
- controlemonsters zijn niet altijd beschikbaar en moeten in zo'n geval zelf gemaakt worden;
- de resultaten zijn meestal binnen 3 uur bekend;
- commercieel verkrijgbare assays kunnen zeer stofspecifiek zijn of in meer of mindere mate groepspecifiek;
- matrixeffecten kunnen in sommige gevallen de resultaten beïnvloeden;
- vals-negatieve resultaten worden niet gevonden;
- het percentage vals-positieve resultaten bedraagt ongeveer 10 %;
- in de meeste assays, behalve die voor isoproturon, speelt kruisreactiviteit een rol en leidt tot verhoogde waarden in vergelijking met die uit referentiemethoden;
- de groepspecifieke assay voor fenylureumherbiciden is geschikt voor screeningsdoeleinden, maar de kit voor PAK leverde onverklaarbare resultaten;
- de detectielimiet kan, in het geval deze boven 0,1 µg/l ligt, door enige aanpassing vaak verlaagd worden;
- het aantal standaarden is inclusief de 0-standaard meestal vier; voor een semi-kwantitatieve assay voor screeningsdoeleinden is dit voldoende, maar om te voldoen aan de DIN-normen moet dit aantal uitgebreid worden tot 6 standaarden;
- de assays zijn uitermate geschikt voor screeningsdoeleinden; in het kader van het early-warning programma van de WRK (Nieuwegein) zijn voor dit doel reeds frequente metingen uitgevoerd in de Rijn voor 2,4-D, isoproturon en fenylureumherbiciden;
- de kosten variëren van Fl.60,- tot Fl.100,- per monster (exclusief personeelskosten) met uitzondering van de groepspecifieke PAK-kit.

### 2.2.3 Toekomstige ontwikkelingen

Naast een gewenste uitbreiding van het aantal met een immunoassay te meten analieten zal normering nodig zijn. Enerzijds van de immunoassay als methode, anderzijds van individuele immunoassays zoals ook reeds in de U.S.A. wordt gedaan door de EPA en de AOAC. Door normering zal de immunoassay op hetzelfde niveau kunnen komen als bijv. HPLC en GC en beschouwd kunnen worden als een zelfstandige analysemethode. Dit biedt de mogelijkheid immunoassays te ontwikkelen voor verbindingen die niet of nog niet met de conventionele analysemethoden gemeten kunnen worden, waarbij uiteindelijk de immunoassay zelfs als referentiemethode kan dienen.

Een verdere ontwikkeling is de multi-analiet-immunoassay. Hiermee wordt tegemoet gekomen aan het probleem dat tot nu toe met een immunoassay slechts één verbinding of groep van verwante verbindingen gemeten kan worden. De combinatie van verschillende antilichamen en tracers in één kit moet het mogelijk maken meerdere analieten of groepen tegelijkertijd in een monster te meten. In tegenstelling tot de conventionele methoden zouden hiermee in één analyse ook (groepen van) verbindingen met geheel verschillende fysisch-chemische

eigenschappen direct in een watermonster gemeten kunnen worden. Met het onderzoek naar de ontwikkeling van multi-analiet-immunoassays voor pesticiden wordt in Nederland in samenwerkingsverband dit jaar gestart.

Een vrij nieuwe ontwikkeling op het gebied van indicatieve immunochemische methoden is de snelle test in de vorm van de membraantest of dipstick. Deze tests zijn ontwikkeld door de groep van Prof. Hock van de Universiteit van München en in beperkte mate reeds getoetst. In beide gevallen wordt gebruik gemaakt van het principe van de immunoassay, waarbij het betreffende antilichaam is gehecht op respectievelijk een membraan of een kunststof staafje. Enzymtracer en chromogeen zijn zo gekozen dat de reactie leidt tot een gekleurd neerslag, dat visueel beoordeeld moet worden. Deze tests zijn zuiver kwalitatief en kunnen in ongeveer 20 minuten uitgevoerd worden.

Als laatste ontwikkeling moet de 'sensor' genoemd worden (zie paragraaf 2.4). Een sensor is een instrument dat het mogelijk maakt zonder beïnvloeding van het te meten monster één of meerdere grootheden in-situ bij herhaling te meten. Het meest bekende systeem is de pH-meter, hoewel ook deze geen sensor is in de ware zin van het woord.

In immunosensoren wordt gebruikt gemaakt van meer of minder specifieke antilichamen. Gedetecteerd wordt de binding tussen antilichaam en antigeen of de competitie tussen gemerkt en ongemerkt antigeen. Een veel gebruikte detectietechniek is de Surface Plasmon Resonance; er zijn reeds enkele apparaten gebaseerd op dit principe op de markt (Pharmacia, Fisons en Intersense). Hierbij wordt een antigeenderivaat gekoppeld op een drager. Antilichaam en monsterantigeen worden over de drager geleid en de binding wordt gedetecteerd en gekwantificeerd. Andere uitvoeringsvormen zijn de geïntegreerde optische sensor [Bier, Jockers en Schmid, 1994], de piezoelektrische kristalsensor [Minnuni, Skladal en Mascini, 1994] en de fiber-optische sensor [Wong, Anis en Eldefrawi 1993]. Met dergelijke immunosensoren kunnen detectielimieten van 0,05 µg/l bereikt worden. Hoewel er al vele artikelen, reviews en boeken gepubliceerd zijn over immunosensoren [Sandberg et al., 1992; Turner, 1991; Turner, 1992; Tran Minh Canh 1993; Kress-Rogers, 1993; Dennison en Turner, 1995], bevindt de ontwikkeling ervan zich vooralsnog op een academisch niveau met echter goede toekomstverwachtingen. Een overzicht van de stand van zaken in Nederland op het gebied van sensoren voor de bepaling van waterkwaliteit is onlangs uitgegeven door het RIKZ [Quist, 1994].

## **2.3 Enzymassays**

### **2.3.1 Inleiding**

Enzymen zijn biochemische katalysatoren die worden aangemaakt door levende organismen. Zij versnellen metabole omzettingen bij temperaturen die (in de buurt liggen) van de lichaamstemperatuur van de organismen waaruit zij afkomstig zijn. Bij dit proces blijven de enzymen zelf onveranderd [Guibault 1984; Lam en Malikin 1994].

Enzymen vinden, volgens een aantal verschillende concepten, toepassingen in analytische methoden voor o.a. de bepaling van waterkwaliteit [Guibault, 1984; Lam and Malikin, 1994; Jager, 1995; Obst en Holzapfel-Pschorn, 1988; Obst, 1995]. De volgende indeling is daarbij mogelijk:

- A in-vivo enzymassays;
- B in-vitro enzymassays;
- C detectie labels voor b.v. Immunoassay technieken (ELISA's);
- D enzym sensoren;
- E geïmmobiliseerde enzym reactoren (IMER's) voor toepassingen in FIA en vloeistofchromatografie systemen.

In deze paragraaf wordt uitsluitend ingegaan op die toepassingen waarbij geïsoleerde enzymen worden gehanteerd (in-vitro enzym-assays) en waarbij de selectiviteit van de methode direct wordt bepaald door de enzymkeuze. Methoden waarbij de enzymen als 'detectielabel' worden gehanteerd (ELISA's e.d.), of waarbij de activiteit van specifieke enzym(systemen) in vivo (of na isolatie uit een organisme) wordt bepaald (in-vivo enzym activiteitstesten) vallen derhalve buiten het doelgebied van deze paragraaf. Ook de toepassing van enzymen in biosensoren en in IMER's zijn hier niet expliciet opgenomen.

In vitro enzym-assays worden al geruime tijd toegepast voor de bepaling van verbindingen die als substraat voor bepaalde enzym(systemen) dienst kunnen doen (glucose en andere suikers, aminozuren, steroid hormonen, antibiotica e.d.) [Guibault, 1984; Lam en Malikin, 1994; Jager, 1995; Byfield en Abukneska, 1994]. Voor dergelijke methoden bestaan met name toepassingen op het gebied van de medische diagnostiek en de voedingsmiddelen-technologie. Aangezien milieuschadelijke verbindingen slechts zelden geschikt zijn om als substraat voor een enzym(systeem) dienst te doen (met uitzondering van b.v. verschillende phenolen) is het aantal toepassingen op het gebied van de milieuanalyse in verhouding achtergebleven. Mogelijkheden voor de toepassing van enzym-assays in de milieuanalyse richten zich vooral op een wat ander aspect van enzymwerking. Bij die toepassingen wordt veelal naar de remming van de activiteit van enzym(systemen), door in het milieu aanwezige verbindingen, gekeken. Veel milieuschadelijke verbindingen, waaronder zware metalen, pesticiden en diverse organische micro-verontreinigingen, hebben een negatieve werking op de activiteit van één of meerdere enzym(systeem)en.

Specifieke informatie, m.b.t. het toepassingsgebied en de prestaties van individuele enzymassays, is opgenomen in bijlage 3. Hieronder wordt een concluderend overzicht gegeven van de resultaten van de inventarisatie van enzymassays voor de bepaling van waterkwaliteitsparameters.

### 2.3.2 Concluderend overzicht van de resultaten

Evenals immunoassays worden in-vitro enzymassays gekarakteriseerd door een hoge mate van selectiviteit, snelheid en kosteneffectiviteit. Ook de gevoeligheid van enzymassays kan, als gevolg van de grote 'turnover' van substraat door enzymen, in principe zeer goed zijn. Dat deze specificaties in praktijk niet altijd gehaald worden is met name een gevolg van de niet zelden lage eigen stabiliteit van geïsoleerde enzymen en de kans op indirecte verstoringen door monstermatrix componenten en pH - en temperatuurinvloeden.

Met uitzondering van de enzymassay voor dithiocarbamaat fungiciden op basis van aldehyde dehydrogenase remming en de enzymassay op basis van horseradish peroxidase remming, zijn de assays die in bijlage 3 besproken worden allen bij benadering voldoende gevoelig voor een zinvolle bepaling van de remmende verbindingen in oppervlaktewater. Daarbij dient nog opgemerkt te worden dat bij de assay op basis van horseradish peroxidase remming in principe niet gestreefd wordt naar het behalen van een zo laag mogelijke detectielimiet, als wel naar een snelle bepaling die correleert met CZV en BZV metingen.

De behandelde assays zijn, met uitzondering van de horseradish peroxidase assay, niet commercieel (als complete testkit) verkrijgbaar. De geïsoleerde enzymen, alsmede de benodigde reagentia, zijn echter eenvoudig los verkrijgbaar. Aangezien bovendien ook volledig uitgewerkte voorschriften voor het uitvoeren van de assays beschikbaar zijn, is het ontbreken van commerciële assay-testkits geen principiële belemmering voor het opnemen van de enzymassays in programma's voor de bepaling van oppervlaktewaterkwaliteit.

Een probleem dat serieuze aandacht verdient betreft de storingsgevoeligheid van enzymassays in het algemeen. Vooralsnog is het niet duidelijk of dit probleem zich ook bij (elk van) de hier besproken enzymassays zal voordoen. Desalniettemin lijkt het verstandig om al in een vroegtijdig stadium de mogelijke oplossingen van dit probleem te inventariseren. Bijvoorbeeld de in hoofdstuk 5 besproken extractie- en preconcentreringstechnieken zouden hier mogelijk uitkomst kunnen bieden. Een bijkomend voordeel van een aantal van deze monstervoorbewerkingstechnieken is gelegen in de inherente concentrering van het monster, waardoor de gevoeligheid van een gecombineerde preconcentrering-enzymassay methode beter kan zijn dan voor een losse enzymassay.

## 2.4 Chemische sensoren

### 2.4.1 Inleiding

Sensoren zijn analytische instrumenten die *in staat zijn* om 'real time' en continue (of met een hoge herhalingsfrequentie), veelal zonder een (uitvoerige) monstervoorbehandeling en regeneratieprocedure, de concentratie van een component of groep van componenten in een specifiek medium in situ vast te stellen. Voor een sensor zijn twee componenten van belang: a) een herkennend systeem (selector); en b) een signaalleverend systeem (omvormer).

Sensoren zijn ruwweg in te delen in een aantal klassen die gekarakteriseerd worden door het type omvormer (detector, transducer) dat gehanteerd wordt:

- A Omvormers op basis van spectroscopische principes, veelal uitgaande van fiber-optische technologieën; directe -, of evanescent field: absorptie, fluorescentie, brekingsindexveranderingen, 'Surface Plasmon Resonance' (SPR), etc.
- B Omvormers op basis van halfgeleider technologie: Ion Selective Field Effect Transistors (ISFET), Metal Oxidified Surface Field Effect Transistors (MOSFET) in combinatie met (micro) Ion Selective Electrodes (ISE).
- C Omvormers op basis van piezoelektrische principes; 'Surface Acoustic Wave' (SAW) en 'Bulk Acoustic Wave' (BAW) technologieën.

De selectiviteit van sensoren wordt in een zeer beperkt aantal gevallen direct bepaald door de manier waarop de sensor gehanteerd wordt (aangebrachte spanning, geselecteerde golflengte, e.d.). In de meerderheid van de gevallen echter wordt de selectiviteit bepaald door een 'interface' (de selector) die op het sensoroppervlak is aangebracht. Deze selector is in staat om, selectief met een bepaalde component of groep van componenten, een interactie aan te gaan, die leidt tot een verandering in een grootte die door de omvormer kan worden waargenomen (totale ionenconcentratie, REDOX koppel, extinctie, fluorescentie intensiteit/golflengte, optische dichtheid/brekingsindex, etc.). De meeste apparaten die sensor genoemd worden, zijn dit in feite niet omdat ze ofwel het monster beïnvloeden, ofwel niet in situ werken, ofwel niet herbruikbaar zijn zonder bewerking. De enige sensor die voldoet aan de eisen is de glucosesensor met amperometrische detectie, die o.a. toegepast wordt in de klinische chemie.



Met grote regelmaat verschijnen reviews, waarin de stand van zaken m.b.t. research en ontwikkeling op het gebied van sensoren voor verschillende toepassingen worden beschreven [Jantra, 1992, 1994; Solsky, 1990; Briggs, 1994; Lynggaard-Jensen, 1994; Mittenzwey, 1994; Yamauchi, 1991; Vaihinger en Goepel, 1991; Flores en Lorenzo, ; Olson en Tsai, 1992; Niessner, 1991; Olthuis, 1993]. Daarnaast wordt in een aantal recentelijk in Nederland gepubliceerde inventarisatie-rapporten tevens uitgebreid aandacht besteed aan de toepasbaarheid en markttechnische aspecten [Quist, 1994; Oort, 1993; Sprangers et al. 1992; Leeuwis et al. 1990]. Het overgrote deel van de informatie m.b.t. toepassingsgebied, gevoeligheid en performance, alsmede de (commerciële) toegankelijkheid van chemische sensoren, zoals opgenomen in bijlage 4, is afkomstig uit de hierboven genoemde documenten. Daarnaast is contact opgenomen met een aantal experts bij de Universiteit van Twente (UT) (Dr. P. van Lambeck en Dr. Ir. W. Olthuis), bij TNO-IMW/TPD (resp. Drs. J.J.F. van Veen en Dhr. Cheng), en bij Twente Technology Transfer (3T) (Drs D.J. Sprangers<sup>2</sup>) voor het verkrijgen van (aanvullende) up-to-date informatie.

Hieronder wordt een concluderend overzicht gegeven van de resultaten van de inventarisatie van chemische sensoren voor de bepaling van waterkwaliteitsparameters. Voor meer specifieke informatie wordt verwezen naar bijlage 4.

#### 2.4.2 Concluderend overzicht van de resultaten

Het concluderend overzicht in deze paragraaf heeft uitsluitend betrekking op chemische sensoren. De mogelijkheden van typische biosensoren, op basis van delen van organismen, zijn niet in deze studie opgenomen (zie paragraaf 2.1.1). Op het gebied van de analyse van pesticiden zijn nog wel twee nauw gerelateerde sensor-herkenningssystemen in het kader van dit rapport van belang, de enzymatische sensor (biochemische reactie) en de immunosensor (complexvorming). De enzymensor gaat uit van het feit, dat bepaalde enzymen door pesticiden in meer of mindere mate geremd worden (zie tevens paragraaf 2.3). Het meest gebruikte enzym is het acetylcholinesterase, dat geremd wordt door organofosfor- en carbamaatpesticiden [Schwedt en Stein, 1992; Stein en Schwedt, 1992]. Verder wordt ook tyrosinase gebruikt dat geremd wordt door di- en trichloorfenolen en door ureumherbiciden [McArdle en Persaud, 1993]. Enzymsensoren zijn groepspecifiek en geschikt voor screeningsdoeleinden. Uit testen met afzonderlijke pesticiden blijkt, dat een detectielimiet tot 0,05 µg/l bereikt kan worden.

Uit de resultaten van de inventarisatie van chemische sensoren (bijlage 4) blijkt dat het overgrote deel van de chemische sensoren zich momenteel nog in een stadium van ontwikkeling bevindt. De toepassingen die al wel voldoende ver zijn uitontwikkeld hebben allen betrekking op relatief eenvoudige waterkwaliteitsparameters (pH, chloride, fluoride, natrium, kalium en calcium). Deze sensoren zouden in het kader van dit project met name zinvol kunnen zijn als gidsparementen. Daarbij zou bijvoorbeeld de (automatische) monsternamen gestuurd kunnen worden door de waarde die continu voor de gidsparement gemeten wordt. Daarbij moet natuurlijk wel een (zekere mate van) correlatie bestaan tussen de parameters waarin men werkelijk geïnteresseerd is en de gidsparement. Op basis van de statistische analyse van de databestanden van een tweetal waterbeheerders (zie hoofdstuk 5) konden in dit kader zinvolle correlaties niet aangetoond worden.

---

<sup>2</sup> De rapportage Sprangers et al. (1992) is een uitgave van het Centrum voor MicroElectronica (CME), in samenwerking met "3T". Het CME is een stichting die de toepassing van o.a. sensortechnieken probeert te stimuleren.

## 2.5 Flow Injectie Analyse (FIA)

Bij het gebruik van chemische sensoren voor het bepalen van specifieke aspecten van de waterkwaliteit blijkt het toevoegen van reagentia, die in enkele gevallen nodig zijn voor de indicatorreactie, vaak een moeilijk op te lossen probleem. Flow-Injectie Analyse (FIA) kan in dergelijke gevallen uitkomst bieden. FIA systemen die gebaseerd zijn op chemische indicatorreacties zijn o.a. ontwikkeld voor de bepaling van fosfaat (ortho en totaal), nitraat (en totaal stikstof), ammoniak, sulfaat, alkaliteit, fluoride, zware metalen<sup>3</sup> en cyanide [Karlberg en Pacey, 1989]. Daarnaast wordt ook steeds vaker gebruik gemaakt van geïmmobiliseerde enzym reactoren (IMER's) [Jager, 1995] en methoden die gebaseerd zijn op antilichamen die aan een vast dragermateriaal gebonden zijn [Wittmann en Schmid, 1994]. Verder wordt er op academisch niveau met grote regelmaat onderzoek gedaan naar detectiemethoden, voor gebruik in FIA of in vloeistof chromatografische systemen, die gebruik maken van een combinatie van technieken voor de selectieve bepaling van o.a. milieuschadelijke verbindingen.

Naast FIA systemen kan er ook gedacht worden aan indicatortests in een batchsysteem. Dr. Lange brengt een aantal van dergelijke bepalingen onder de naam Kuvettentest op de markt. Parameters die in het pakket voorkomen zijn o.a. ammonium, BZV, cadmium, chloride, chroom, cyanide, CZV, Fenol, Fluoride, fosfaat (ortho en totaal), ijzer, kalium, koper, totaal N, lood, nikkel, nitraat, nitriet, sulfaat, tin en zink. Daarbij moet echter opgemerkt worden dat de detectielimieten voor bijvoorbeeld cadmium (20 ppb), koper (10 ppb), lood (100 ppb) en nikkel (50 ppb) niet toereikend zijn voor een zinvolle bepaling van deze metalen in oppervlaktewater. Bepalingen in effluenten liggen hier meer voor de hand. In het kader van dit project zijn de mogelijkheden die dergelijke technieken bieden (FIA en batch systemen) vooralsnog niet uitgebreid geïnventariseerd.

---

<sup>3</sup> De methoden die hiervoor gehanteerd worden zijn over het algemeen eigenlijk gebaseerd op geautomatiseerde AAS, of ionselectieve elektrode detectie.



## 3 GROEPS- EN SOMPARAMETERS

### 3.1 Inleiding

Dit hoofdstuk gaat in op de mogelijkheid gebruik te maken van de bepaling van groeps- of somparameters, dan wel breed screenende technieken met als doel een indicatie te geven van (veranderingen van) waterkwaliteit. Hierbij wordt ingegaan op de volgende bepalingen: totaalgehalte vluchtig organokoolstof (VOC), adsorbeerbaar organohalogenen (AOX), extraheerbaar organostikstof (EON), bepaling van organotin (na extractie) met AAS en multi-componentscreening met bijv. HPLC en UV- of diodearray detectie.

Behalve de hier beschreven chemische groeps- en somparameters is nog een aantal andere indicatieve parameters bekend, dan wel zijn op basis van chemische en analytische eigenschappen aanvullende groepsparameters te definiëren.

Groepsparameters als fenol-index, minerale olie-index en (anionische) detergenten worden al veelvuldig toegepast bij het onderzoek naar oppervlaktewaterkwaliteit en deze worden dan ook verondersteld bekend te zijn.

### 3.2 Totaal-organo 'element' bepaling

Bij totaal-organo 'element' bepalingen wordt een fysisch-chemisch goed gedefinieerd deel van het totaal aan organische verbindingen uit een watermonster geëxtraheerd. Daarbij zijn verschillende extractie-methoden toepasbaar, elk met een eigen scala aan te extraheren verbindingen. Het meest gangbare onderscheid in te 'extraheren' verbindingen ziet er als volgt uit:

- vluchtige verbindingen (VO.);
- petroleum-ether extraheerbare verbindingen (EO.);
- XAD-hars extraheerbare verbindingen (XO.);
- Actieve kool adsorbeerbare verbindingen (AO.)

Volgend op deze extractie wordt de totaalconcentratie van een specifiek element in de geëxtraheerde fractie bepaald. Daarbij bestaan de volgende, meest toegepaste, mogelijkheden:

- bepaling van het halogeen-gehalte (..OX);
- bepaling van het stikstof-gehalte (..ON);
- bepaling van het fosfor-gehalte (..OP);
- bepaling van het zwavel-gehalte (..OS).

De combinatie van extractiemethode en elementbepaling bepaalt de overall selectiviteit van de methode en leidt tot omschrijvingen als Adsorbeerbare Organo Halogeenverbindingen (AOX). Uitgebreidere informatie m.b.t. extractieprocedures en elementbepalingen is opgenomen in bijlage 5.

### 3.3 Totaal-organotin bepaling (OSN/AAS)

De totaal-organotin bepaling is in principe ook een organo 'element' bepaling. Extractie vindt plaats met petroleum-ether, waarna de organotin-verbindingen van Atomaire Absorptie Spectroscopie (AAS) worden bepaald als totaal-organotiningehalte. Uitgebreidere informatie is opgenomen in bijlage 6.

### 3.4 Organische microverontreinigingen (HPLC/UV-fingerprints)

Met behulp van vaste fase extractie (SPE) on-line gekoppeld met HPLC-scheiding en UV-detectie kan een zeer breed scala aan organische verbindingen zichtbaar worden; variërend van apolair tot polair. In een eerste benadering kunnen bepaalde karakteristieken van het chromatografisch piekenpatroon gehanteerd worden als maat voor de aanwezigheid van verontreinigingen in het te analyseren watermonster. Vervolgens kan, gebruikmakend van dezelfde ruwe analyseresultaten, in een tweede benadering het monster met dezelfde methode op de aanwezigheid van specifieke verbindingen gescreend worden.

Een nadere uiteenzetting van beide benaderingen, alsmede een uitgebreidere toelichting op extractie-, scheidings- en detectieprocedures, is opgenomen in bijlage 7.

### 3.5 Elementspecifieke organische microverontreinigingen (GC/AED-fingerprints)

Met behulp van een niet-specifieke extractie worden organische verbindingen uit water geëxtraheerd, waarna met behulp van GC/AED element-specifiek het totaalgehalte aan hetero-element verbindingen wordt vastgesteld.

Met deze methode kan een karakteristiek beeld verkregen worden voor de totale hoeveelheid van een bepaald element in het gaschromatografeerbare, organische materiaal. Aangezien een verontreiniging met organische stoffen zich in het algemeen zal uiten in een toename van het gaschromatografeerbare materiaal, wordt met de GC/AED-fingerprint een indicatie van de verontreinigingsgraad verkregen. De aard van de gemeten stoffen wordt mede bepaald door de gekozen extractie-procedure.

Meer specifieke informatie is opgenomen in bijlage 8.

### 3.6 Concluderend overzicht van de resultaten

Een groepsparameter voor 'totaalgehalte vluchtige organische verbindingen' (VOC, Volatile Organic Carbon) zou mogelijk interessant kunnen zijn om de verontreiniging van water en slib met deze groep van verbindingen te monitoren. Echter de gaschromatografische bepaling van afzonderlijke vluchtige verbindingen met gasstrip-GC is bij veel laboratoria al operationeel. Aangezien dit een methode betreft die weinig gecompliceerder is dan de VOC-bepaling, verdient het geen aanbeveling VOC (verder) te ontwikkelen.

Wat betreft de OX-metingen worden VOX en EOX routinematig toegepast bij de kwaliteitsbewaking van oppervlaktewater. Het opnemen van AOX in de meetprogramma's levert extra gegevens over de meer polaire organohalogeene-verbindingen, terwijl de verhouding AOX/EOX informatie levert over de aard van de verontreiniging met organohalogeene. XOX in de huidige (groot-volume) vorm heeft alleen zin indien een koppeling met een bioassay als de Ames-test gewenst is. Vooralsnog is de XAD-isolatie te kostbaar om deze als routinebepaling op te nemen.

Dit geldt ook voor de XON-bepaling voor het gehalte aan organostikstof-verbindingen. De EON-bepaling daarentegen is relatief eenvoudig en zinvol op te nemen in monitorprogramma's voor het meten van diverse prioritaire organostikstof-verbindingen.

Zowel de totaalbepalingen voor organofosfor als voor organozwavel zijn als groepsparameter gecompliceerder dan de op microcoulometrie gebaseerde OX- en ON-bepalingen. Uitzondering hierop vormt de microcoulometrische AOS-bepaling. Gezien het op grote schaal voorkomen van organische zwavel- en fosforverbindingen van natuurlijke herkomst, waaronder als bestanddeel van 'humeus materiaal', is de betekenis voor de waterkwaliteit onduidelijk. De verwachting is dat in de praktijk vooral deze natuurlijke verbindingen gemeten zullen worden, waardoor de bepaling als indicatie voor verontreiniging niet voldoet.

De GC/AED-fingerprint levert een grote hoeveelheid element-specifieke detail-informatie over de aanwezigheid van extraheerbare en gaschromatografeerbare verbindingen. De AED is echter een kostbaar instrument (circa f. 250.000,-) die bovendien het nodige aan expertise vereist en sterk onderhoudsgevoelig is. Voor routine-toepassingen wordt de AED dan ook nog niet breed ingezet, en verdient het op dit moment nog geen aanbeveling om deze techniek voor de bewaking van de oppervlaktewater kwaliteit te ontwikkelen c.q. te evalueren.

Dit zou wel kunnen gelden voor de totaalbepaling organotin met behulp van extractie en AAS meting. Hiermee is een zeer goede gevoeligheid te bereiken, en wordt gebruik gemaakt van technieken en expertise die aanwezig zijn bij de laboratoria van waterbeheerders. Kanttekening hierbij is dat deze technieken (extractie en AAS) nog vrijwel niet in deze combinatie worden toegepast, waardoor de praktijkervaring nog erg beperkt is.

De technieken voor HPLC/UV-fingerprints zijn eveneens op de laboratoria beschikbaar, en de HPLC/UV-analyse heeft zich bewezen als robuuste routinematig toepasbare analysetechniek voor de meting van organische microverontreinigingen. Apparatuur en expertise zijn in afdoende mate voorhanden, en qua uitvoeringsvorm kan aangesloten worden bij wat in de verschillende laboratoria operationeel is. HPLC/UV als analysetechniek voor het monitoren van een groot aantal bekende verontreinigingen ('target compounds') is sterk in opkomst (oa. het gebruik van 'SAMOS' bij de meetstations van RIZA in Eijsden en Lobith). Het gebruik van de HPLC/UV-techniek voor fingerprints als parameter voor het beschrijven van de waterkwaliteit (niveau 1 uit bijlage 7: aanvullende methoden) wordt nog niet veelvuldig toegepast. Nader onderzoek, wat zich met name richt op de interpretatie van analyseresultaten en chromatogrammen, en minder op de ontwikkeling van de techniek, zou moeten resulteren in een goed gedefinieerde kwaliteitsparameter. De HPLC-techniek, eventueel in combinatie met andere detectie-systemen zoals diode array detectie of massaspectrometrie in plaats van UV-detectie, biedt de mogelijkheid om, op basis van de fingerprint, meer specifieke gegevens te verkrijgen met betrekking tot de aanwezigheid en concentratie van verontreinigingen (niveau 2 tot en met 5 uit bijlage 7: aanvullende methoden). Het verdient sterke aanbeveling om de HPLC/UV-fingerprint nader te onderzoeken en te komen tot een op deze techniek gebaseerde waterkwaliteitsindex. Tabel 2 op de volgende pagina geeft een overzicht van deze concluderende opmerkingen.

Tabel 2 Indicatie van de omvang van het toepassingsgebied

parameter	toepassingsgebied	nader onderzoek vereist	belang
AOX	++	+	+
EON	++	+	+
OSn/AAS	+	++	++
HPLC/UV	+++	++	+++

+ / ++ / +++ geeft een indicatie van de omvang

#### 4 EXTRACTIE EN PRECONCENTRERING

In een aantal gevallen is de gevoeligheid van de in de voorafgaande paragrafen beschreven indicatieve analytische methoden niet voldoende voor een zinvolle bepaling van milieuschadelijke componenten in oppervlaktewater. Daarnaast ontstaan er in een aantal gevallen mogelijk problemen met de herhaalbaarheid van de tests. Deze problemen zijn enerzijds het gevolg van de eigen instabiliteit van een aantal biologische materialen, maar anderzijds veelal ook het gevolg van verstoringen door aanwezige matrixcomponenten (o.a. humuszuren). Het gebruik van een extractie stap voorafgaande aan de werkelijke bepaling kan in veel gevallen leiden tot een sterke afname van het aantal mogelijk storende matrixcomponenten. Als een dergelijke extractiestap bovendien leidt tot een concentrering van de te bepalen verbindingen, kan daarmee vaak ook het gevoeligheidsprobleem verholpen worden. Bij veel van de technieken voor de bepaling van groeps en somparameters, die in hoofdstuk 3 behandeld worden, is een dergelijke monstervoorbewerkingsstap al een integraal onderdeel van de methode. Hieronder wordt een beknopt overzicht gegeven van de verschillende mogelijke extractie/preconcentreringstechnieken die bekend zijn:

- Vloeistof-vloeistof extractie (bijv. dichloormethaan, hexaan, octanol, ethylacetaat)
- Empore schijf extractie ( $C_{18}$ , styrene-divinylbenzene(PLRP-S), XAD harsen (XAD-1,2,4,7,8).
- Vaste fase Extractie ( $C_2$ ,  $C_8$ ,  $C_{18}$ , cyclohexyl, cyanopropyl, grafiet koolstof, polystyreen-divinylbenzene dragermaterialen (PLRP-S), XAD harsen (XAD-1,2,4,7,8)).
- Ionenwisselaars

Enige geaggregeerde basisinformatie over deze extractie en preconcentreringstechnieken kan o.a. verkregen worden uit de referenties [van Loon en Hermens, 1995; Verhaar et al., 1994; van Beveren en Noordsij, 1981; Brouwer, 1995; Marco-Varga en Emnéus, 1994b]. Daarnaast is er de laatste jaren ook steeds meer interesse ontstaan voor meer experimentele technieken als Supercritische Vloeistof Extractie (SFE), (elektro)dialyse, immunologische monstervoorbewerking en ultrafiltratie.

Met uitzondering van immunologische monstervoorbewerking (specifieke interacties) is de werking van de meeste van deze methoden gebaseerd op fysisch-chemische interacties; adsorptie, 'solvatatie', sterische exclusie, ionogene interactie. De keuze voor een bepaalde methode en extractiemateriaal zal derhalve gerelateerd zijn aan de fysisch-chemische eigenschappen van de te bepalen verbindingen; hydrofobiciteit, massa, complexerend vermogen, e.d.

In het kader van dit project is geen uitputtende inventarisatie gemaakt van de mogelijkheden die verschillende extractie/preconcentreringstechnieken, in combinatie met assays uit de voorgaande paragrafen, bieden. Dit o.a. omdat de keuze voor een specifieke extractie/preconcentreringsprocedure sterk afhangt van de gekozen indicatieve analytische methode en de verbindingen waarop deze van toepassing is.

De potentiële mogelijkheden, die deze monstervoorbewerkingstechnieken bieden, dienen echter wel in ogenschouw genomen te worden bij de beoordeling van de verschillende assays voor vervolgonderzoek.





## 5 STATISTISCHE ANALYSE VAN WATERKWALITEITSGEGEVENS

### 5.1 Inleiding

Om bestaande correlaties tussen chemische waterkwaliteitsparameters te inventariseren zijn databestanden van een aantal waterbeheerders statistisch geanalyseerd op het bestaan van correlaties tussen de gemeten chemische parameters (MILBOWA parameters en aanvullend gemeten bestrijdingsmiddelen). Het bestaan van dergelijke correlaties zou mogelijkheden kunnen bieden om het analysepakket van de waterbeheerders te verkleinen. Immers, wanneer twee parameters een duidelijke en ondubbelzinnige onderlinge correlatie vertonen, is het niet strikt noodzakelijk om beiden (met dezelfde frequentie) te blijven meten. Eén van beide parameters kan dan, op basis van de resultaten die voor de andere parameter verkregen worden, berekend worden. Daarbij zou de te berekenen parameter nog met een zeer geringe frequentie gemeten kunnen worden om steekproefsgewijs te kunnen controleren of de correlatie tussen beide parameters nog bestaat.

In totaal werden voor twee waterbeheerders databestanden geanalyseerd: Hoogheemraadschap van Rijnland (Hhs-RL) en Hoogheemraadschap Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier (Hhs-US).

### 5.2 Werkwijze

Bij de statistische analyse van de databestanden van Hhs-RL en Hhs-US is gebruik gemaakt van het statistisch softwarepakket SPSS.

#### 5.2.1 Beschrijvende statistiek

Om een geaggregeerd overzicht te kunnen krijgen van de data die, voor de individuele parameters, in de databestanden opgenomen zijn, werd voorafgaande aan de correlatie-analyse de beschrijvende statistiek uitgewerkt. Daarbij werden de volgende aspecten van de data geëvalueerd (alleen voor de individuele parameters en over de periode waar de databestanden betrekking op hebben):

- Het aantal data beneden de detectielimiet;
- De opgegeven minimale en maximale waarden voor de detectielimieten;
- Het aantal data boven de detectielimiet;
- De gemeten minimale en maximale waarden voor de data boven de detectielimiet;
- De gemiddelde waarde voor de data boven de detectielimiet.

Op basis van de gegevens, die uit de beschrijvende statistische analyse verkregen werden, werden een beperkt aantal parameters geselecteerd voor het uitvoeren van de correlatie-analyse. Daarbij werden de volgende criteria gesteld:

- Het aantal gemeten waarden dient groter te zijn dan 100:  
Dit criterium is gesteld om de kans dat bij paarsgewijze correlatie-analyse het aantal meetpunten te gering wordt voor een betrouwbare interpretatie (ca. < 10 paarsgewijze meetresultaten) voldoende klein te houden.
- De range van meetwaarden dient groter te zijn dan 50 maal de laagst gemeten waarde:

Dit criterium is gesteld om er zeker van te kunnen zijn dat mogelijke correlaties over een voldoende groot bereik aan meetwaarden geëvalueerd kunnen worden.

- De gemiddelde waarde over de beschouwde periode dient tenminste drie maal de detectielimiet te bedragen:

Dit criterium is gesteld om te voorkomen dat het al dan niet bestaan van correlaties voornamelijk bepaald wordt door meetgegevens in de buurt van de detectielimiet.

Voor een beperkt aantal parameters dat op basis van de parameteromschrijving als zodanig toch interessant leek voor vervolgonderzoek werd een uitzondering op deze criteria gemaakt. Daarbij werd wel gesteld dat slechts in geringe mate (< ca 10%) van de criteria afgeweken mocht worden. Een overzicht van de in de databestanden opgenomen parameters en de selectie daaruit, waarvoor correlatie-analyse werd uitgevoerd, is weergegeven in tabel I achter in het rapport.

### 5.2.2 Correlatie-analyses

Voor het uitvoeren van de correlatie-analyse werd in een eerste stap de kruiscorrelatie tussen elke set van twee parameters berekend. Daarbij werden alleen de - op basis van bovenstaande criteria - geselecteerde parameters meegenomen. Bovendien werden kruiscorrelaties uitsluitend binnen de individuele databestanden geëvalueerd: respectievelijk 'MILBOWA' parameters Hhs-RL, bestrijdingsmiddelen Hhs-RL en 'MILBOWA' parameters Hhs-US.

Voor het toetsen van kruiscorrelatie werd gebruik gemaakt van de berekende Pearson-correlatiecoëfficiënt (voor een lineair verband volgens de kleinste kwadraten methode) voor de diverse parameterparen. Evaluatie van de Pearson-correlatiecoëfficiënt tegen een toetstabel vormt een parametrische toets voor de significantie van de correlatie<sup>4</sup>. Aangezien het aantal paarsgewijze meetwaarden over het algemeen aanmerkelijk veel groter bleek te zijn dan 10 kon, zonder een al te grote afwijking te krijgen in het significantie-niveau van de correlatie, één enkele toetswaarde als criterium voor een betrouwbare correlatie gesteld worden. Algemeen werden initieel de volgende twee criteria gesteld voor het bestaan van een voldoende betrouwbare correlatie:

- De Pearson correlatiecoëfficiënt moet groter zijn dan 0.89;
- het aantal paarsgewijze meetpunten moet groter zijn dan 10.

In alle gevallen leidde dit criterium tot een significantie-niveau (kans op een type I fout) kleiner dan 0.1 %; d.w.z. een betrouwbaarheid groter dan 99.9%.

In aanvulling op deze toets werd, voor elk van de parametercombinaties met een positieve uitslag van de correlatietoets, nog een F toets voor lineariteit uitgevoerd<sup>5</sup>. Voor alle gevonden correlaties leidde deze toets tot een significantie-niveau (kans op een type I fout) voor het gevonden lineaire verband dat kleiner was dan 0.01%; een betrouwbaarheid van het gevonden lineaire verband groter dan 99.99%.

Tot slot werden nog de parameters van het gevonden lineaire verband (richtingscoëfficiënt en intercept) getoetst. Dit gebeurt op basis van de gevonden waarden voor de richtingscoëffici-

---

<sup>4</sup> De  $H_0$  hypothese die hier getoetst wordt, is: 'het ontbreken van correlatie met een lineair verband op basis van de kleinste kwadraten methode'.

<sup>5</sup> De  $H_0$  hypothese bij deze toets is: 'het ontbreken van een lineair verband' tussen de beide parameters.

ent, het intercept, de standaardafwijkingen in deze waarden en het aantal vrijheidsgraden/paarsgewijze meetgegevens<sup>6</sup>. Deze toets leidde in alle gevallen tot een significantieniveau, voor de gevonden richtingscoëfficiënt, kleiner dan 0.01% (betrouwbaarheid groter dan 99.99%). Voor het gevonden intercept bleek het significantie-niveau in een groot aantal gevallen veel hoger te liggen. Dit houdt in dat bij veel van de gevonden lineaire verbanden de kans dat het intercept in werkelijkheid nul bedraagt, terwijl een waarde groter of kleiner dan nul is berekend, vrij groot is (soms oplopend tot boven de 50%). Dit wil zeggen dat veel van de gevonden correlaties met een grote waarschijnlijkheid door de oorsprong gaan.

### 5.3 Resultaten

De resultaten van de statistische analyse geven aan dat met name in drie hoofdgroepen van parameters sterke onderlinge correlaties aangetoond konden worden. Deze hoofdgroepen zijn:

- 1 Een aantal basisparameters (natrium, kalium, magnesium, chloride, geleidbaarheid, ortho-fosfaat en totaal fosfor);
- 2 een aantal Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen (PAK);
- 3 een aantal organochloor bestrijdingsmiddelen.

Deze correlaties kunnen grotendeels op basis van respectievelijk natuurlijk voorkomen, gezamenlijk voorkomen in producten (v.n.l. teren en oliën) en gezamenlijk gebruik verklaard worden. De individuele groepen worden in de paragrafen 5.3.1 en 5.3.2 kort besproken. Verder werd nog een vanzelfsprekende correlatie gevonden tussen troebelings en onopgeloste bestanddelen in de data van Hhs-US. Tot slot werd in de data van Hhs-RL een correlatie gevonden tussen chlorofyl-a en 2,3,4,6 tetrachloorfenol. Een oorzaak voor deze correlatie kon niet gevonden worden. De kans is groot dat hier sprake is van een toevallige correlatie.

#### 5.3.1 Basisparameters

Voor de datasets van zowel Hhs-US als Hhs-RL werd een correlatie aangetoond tussen ortho-fosfaat en totaal fosfaat onderling. Daarnaast konden voor de dataset van Hhs-US correlaties aangetoond worden tussen magnesium, kalium, natrium en geleidbaarheid onderling. Voor deze lichte kationen en geleidbaarheid konden correlaties aangetoond worden voor alle 6 mogelijke combinaties.

Voor de dataset van Hhs-RL konden uitsluitend onderlinge correlaties aangetoond worden tussen natrium, chloride en geleidbaarheid (kalium is niet meegenomen in de correlatieanalyse). Voor het ontbreken van magnesium in deze reeks kon vooralsnog geen verklaring gegeven worden (de correlatiecoëfficiënt van magnesium tegen geleidbaarheid was 'slechts' 0.8343 en daarmee dus lager dan het gestelde criterium).

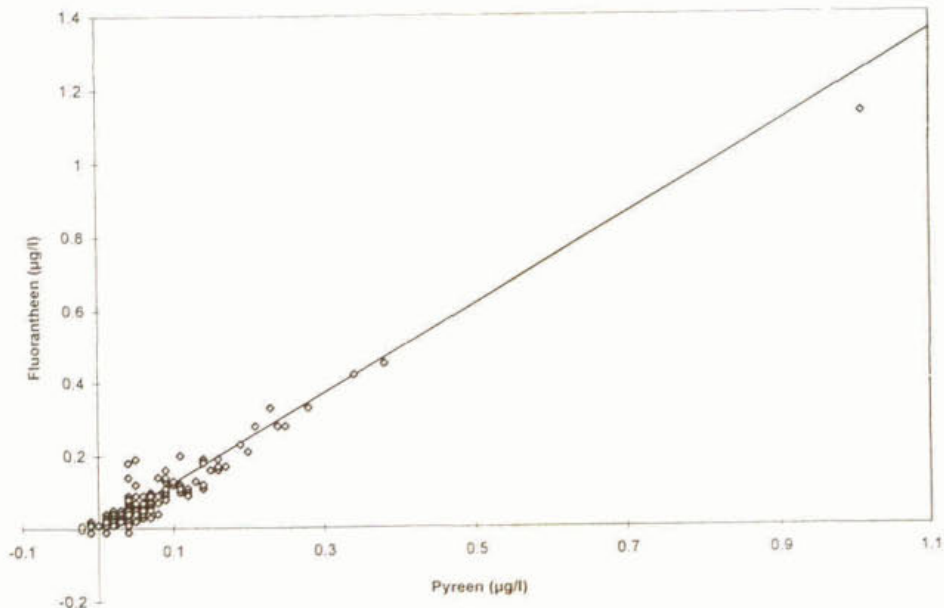
#### 5.3.2 PAK

Voor de PAK konden in het databestand van Hhs-US correlaties aangetoond worden voor pyreen, benzo(k)fluorantheen, benzo(b)fluorantheen, dibenz(ah)anthraceen, benzo(a)anthra-ceen, benzo(a)pyreen, chryseen en fluorantheen onderling. Voor deze 8 PAK kunnen in totaal 28 combinaties opgesteld worden  $\left(\frac{((8 \times 8) - 8)}{2}\right)$ . Van deze 28 werden voor 24 combinaties ook daadwerkelijk correlaties gevonden. De vier ontbrekende combinaties hebben allen

<sup>6</sup> De  $H_0$  hypothese bij deze toets is dat de richtingscoëfficiënt en/of het intercept gelijk zijn aan nul.

betrekking op fluorantheen; de combinaties met benzo(k)fluorantheen, dibenzo(ah)anthraaceen, benzo(a)pyreen en chryseen. Opvallend is daarbij dat de combinaties van fluorantheen met de resterende PAK juist erg goede correlaties en resultaten van de F-toets opleverden. In figuur 1 is de correlatie tussen pyreen en fluorantheen grafisch weergegeven.

Figuur 1 Scatterplot en regressielijn voor de combinatie fluorantheen-pyreen (dataset Milbowa Hhs-US)



In de databestanden van Hhs-RL konden correlaties aangetoond worden voor benzo(ghi)peryleen, benzo(k)fluorantheen, benzo(a)pyreen, dibenz(ah)anthraceen onderling. Voor deze 4 PAK werden voor alle 6 de mogelijke combinaties  $((4 \times 4) - 4) / 2$  daadwerkelijk correlaties gevonden. Daarnaast werden correlaties gevonden voor naftaleen en acenaftheen, voor pyreen en fluorantheen en voor chryseen en benzo(a)anthraceen. Bovendien werd een min of meer vanzelfsprekende correlatie gevonden voor PAK (som 10 ENW PAK) met chryseen en - minder vanzelfsprekend - met dibenzo(ah)anthraceen.

### 5.3.3 Organochloor bestrijdingsmiddelen

Uitsluitend voor de databestanden van Hhs-RL konden correlaties tussen de verschillende organochloor bestrijdingsmiddelen onderzocht worden. Deze parameters waren voor de databestanden van Hhs-US al in een eerder stadium (na de beschrijvende statistische analyse) wegens een gebrek aan meetwaarden komen te vervallen. Voor Hhs-RL (bestrijdingsmiddelen database) konden correlaties aangetoond worden tussen DDT en de metabolieten DDD en DDE in alle drie de mogelijke combinaties. Daarnaast konden correlaties aangetoond worden tussen dieldrin, endrin, endosulfan-a, endosulfan-b, heptachloor-epoxide en hexachloorbenzeen (HCB) voor negen van de vijftien mogelijke combinaties. De ontbrekende combinaties hebben betrekking op endosulfan-a met dieldrin, endrin, heptachloor-epoxide en HCB en op endrin met dieldrin, endrin en HCB. Een algemene trend voor minder sterke correlaties met endosulfan-a en/of endrin kon niet aangetoond worden. Binnen het standaard meetpakket van Hhs-RL kon uitsluitend een correlatie aangetoond worden tussen dieldrin en aldrin. Alle overige organochloorbestrijdingsmiddelen waren reeds in een

eerder stadium (na de beschrijvende statistische analyse) afgevallen vanwege een gebrek aan meetwaarden. Aldrin was al in een eerder stadium komen te vervallen binnen de analyse van het speciale bestrijdingsmiddelen pakket van Hhs-RL.

## 5.4 Conclusies

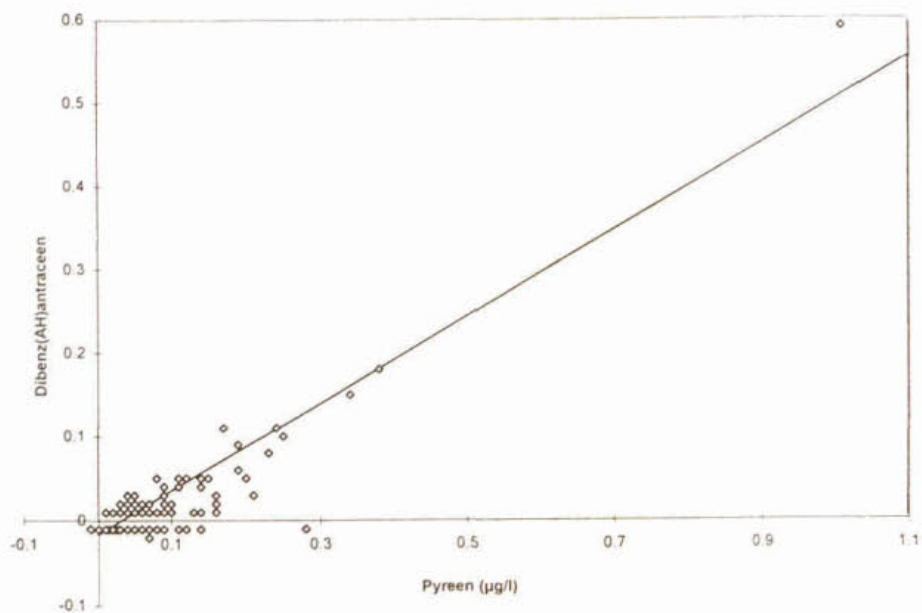
Het is opvallend dat de resultaten, die in paragraaf 5.3 besproken werden, vrijwel allen betrekking hebben op correlaties tussen parameters onderling waarvoor dit ook verwacht mocht worden. Deze uitkomst is opvallend, omdat de correlatie-analyses grotendeels 'blind' werden uitgevoerd. Tijdens de selectie op het al dan niet aantoonbaar zijn van correlaties waren slechts de parametercodes beschikbaar; de parameter omschrijvingen waren in afzonderlijke files opgenomen. Het feit dat, binnen de drie in paragraaf 5.3 genoemde hoofdgroepen, vrijwel alle mogelijke combinaties een positief resultaat gaven, geeft derhalve aan dat de gehanteerde statistische methode goed in staat blijkt te zijn om dit soort correlatie-analyses uit te voeren.

Dat meer interessante onverwachte correlaties grotendeels ontbreken is mogelijk te wijten aan de vrij zware criteria, die voor het bestaan van correlatie gesteld werden. Gezien de uitgebreidheid van de databestanden is het echter alleen mogelijk om minder zware criteria te stellen, wanneer de databestanden vooraf worden opgesplitst in kleinere eenheden voor verwante parameters. Bij een dergelijke vervolganalyse moet er echter wel rekening mee gehouden worden dat de daarbij nog aan te tonen correlaties in alle gevallen een aanmerkelijk hoger significantie-niveau zullen hebben (lagere betrouwbaarheid).

Algemeen dient nog een kanttekening geplaatst te worden bij de gevonden correlaties. Indien de gegevens voor één van beide (dan wel beide) parameters, in een getallenpaar, een meetwaarde onder de detectielimiet betrof, werd dit getallenpaar niet in de correlatie-analyse meegenomen. In een relatief groot aantal gevallen leidt dit echter tot significante correlaties tussen een tweetal parameters, waarbij voor één van beide parameters (hoge) meetwaarden voorkomen die gepaard zijn aan waarden onder de detectielimiet voor de andere parameter. Dergelijke getallenparen voldoen derhalve niet aan de geconstateerde correlatie ('afwijkende getallenparen'). Een verklaring, voor het bestaan van afwijkende getallenparen, kan eventueel nog gezocht worden in het incidenteel voorkomen van hoge detectielimietwaarden voor individuele parameters. Dergelijke hoge detectielimietwaarden kunnen ontstaan als gevolg van matrixeffecten, die kunnen leiden tot een relatief grote onzekerheid in bepaalde gebieden van het 'analytisch window' van een bepalingmethode. Voornamelijk is deze mogelijkheid niet onderzocht. Indien echter het aantal afwijkende getallenparen groot is (t.o.v. het aantal getallenparen waarop de correlatie-analyse gebaseerd is) dient mogelijk aan de gevonden correlatie getwijfeld te worden. Met name voor de polycyclische aromatische koolwaterstoffen is het aantal afwijkende getallenparen relatief soms zeer groot.

In figuur 2 is voor een correlatielijntje tussen twee PAK (Hhs-US) geïllustreerd hoe een goede correlatie gekoppeld kan zijn aan een relatief groot aantal getallenparen die, als gevolg van een detectielimietwaarde voor één van beide parameters, niet aan die correlatie voldoen. Detectielimietwaarden zijn in de figuur als negatieve waarden weergegeven. De figuur laat zien dat, wanneer voor één van beide variabelen een waarde onder de detectielimiet gevonden wordt, de waarde voor de andere variabele veelal ook laag is. Vermoedelijk is hier vooral sprake van analytische problemen.

Figuur 2 Scatterplot en regressielijn voor de combinatie dibenz(AH)antraceen-pyreen (dataset Milbowa Hhs-US)



## 6 ALGEMENE CONCLUSIE

### 6.1 Indicatieve analytische methoden

De geïnventariseerde indicatieve analytische methoden kunnen ingedeeld worden in twee groepen:

- A assaytechnieken (bioassays, immunoassays en enzymassays);
- B sensortechnieken en FIA systemen.

Voor de assaytechnieken kan geconcludeerd worden dat deze in principe veelal geschikt zijn voor vervolgonderzoek in fase 2. Voor de immunoassays betekent dit dat ze zonder veel problemen in de experimentele ronde van fase 2 opgenomen kunnen worden. Voor de bioassays en enzymassays zal voorafgaande aan deze experimentele ronde nog enige aanvullende informatie verzameld moeten worden. Het gaat daarbij met name om informatie op het gebied van de monstervoorbewerking die noodzakelijk is voor het verbeteren van de gevoeligheid en/of het verminderen van matrixverstoringen. Voor elk van de drie assaymethoden kan het inventariseren van aanvullende informatie over kruisreactiviteit en andere interferenties leiden tot een aanzienlijke afname de werkzaamheden die anders in fase 2 zouden moeten worden uitgevoerd om dergelijke effecten te bepalen. Omdat fase 1 bijzonder breed was opgezet (veel verschillende technieken werden geïnventariseerd) was veelal voor het verzamelen van detailinformatie bij de individuele tests onvoldoende tijd beschikbaar. Het gevolg daarvan is dat punten als storingsgevoeligheid, monstervoorbewerkingsprocedures en kosten aspecten veelal slechts globaal afgedekt konden worden. Alvorens een planning gemaakt kan worden van de in fase 2 uit te voeren werkzaamheden, voor elk van de geselecteerde individuele testen, is voldoende dekkende informatie op deze punten noodzakelijk.

Voor sensoren wordt eigenlijk geconcludeerd dat deze wel een hoog potentieel hebben voor toepassing in de milieuanalyse, maar dat de ontwikkelingen zich voor het grootste deel nog in een academisch stadium bevinden.

Daarnaast zou er waar het biosensoren betreft meer tijd noodzakelijk zijn om een inventarisatie uit te voeren. Alleen dan kan ook op dat punt tot een evenwichtige conclusie gekomen worden. Mogelijk zou een dergelijke vervolginventarisatie nog kunnen leiden tot het duiden van een aantal toepassingen die zich inmiddels in een demonstratiestadium bevinden.

Voor FIA systemen en indicatortesten in batchsystemen is in fase 1 slechts een uiterst summiere inventarisatie uitgevoerd. Op basis van deze beknopte gegevens kunnen deze methoden onvoldoende beoordeeld worden.

### 6.2 Groeps- en somparameters

Op het gebied van de groeps- en somparameters gaat de voorkeur duidelijk uit naar bepalingen als AOX, EON, OSn/AAS en HPLC fingerprint. Deze technieken zijn, meer dan de andere geïnventariseerde parameters voldoende zinvol, voldoende eenvoudig uit te voeren, maar nog niet alom bekend. Daarnaast brengt de bepaling van deze parameters geen onevenredig grote startkosten met zich mee (apparatuur is veelal al bij de waterbeheerders aanwezig).

Verder wordt in paragraaf 3.6 enige extra aandacht besteed aan de bepaling van VOC. Daarbij wordt geconcludeerd dat, hoewel VOC op zich een interessante parameter is, deze



door het gebruik van gasstrip GC voor afzonderlijke vluchtige verbindingen 'voorbij gestreefd' lijkt te zijn. Ook screening m.b.v. GC/AED wordt aangeduid als een methode die zinvolle resultaten kan opleveren. De hoge startkosten die met het gebruik van deze methode gemoeid zijn zullen echter een aanzienlijk struikelblok vormen.

### 6.3 Statistische analyse waterkwaliteitsgegevens

De gehanteerde statistische methode blijkt goed in staat te zijn om correlatie analyses uit te voeren. Onder de gehanteerde criteria, voor significantie van het gevonden verband, zijn er echter geen onverwachte correlaties aangetoond. In het kader van dit project werden derhalve geen verdere statistische vervolganalyses uitgevoerd.

### 6.4 Selectie van methoden voor tweede fase vervolgonderzoek

Uitgaande van de tijdens deze eerste fase van het onderhavige project vergaarde gegevens, heeft de begeleidingsgroep zich een oordeel gevormd m.b.t. de indicatieve methoden en groeps- en somparameters die het meestbelovend zijn (op basis van prestaties en toegankelijkheid) voor een indicatieve bepaling van waterkwaliteit. De geselecteerde methoden komen in aanmerking voor vervolgonderzoek tijdens een tweede fase van dit project. De begeleidingsgroep heeft zich in haar oordeel laten leiden door:

- de argumenten die door de auteurs in deze rapportage naar voren zijn gebracht;
- eigen ervaringen met de besproken technieken;
- de mogelijkheden om de technieken op korte termijn voor de waterbeheerders toegankelijk te maken;
- de mate waarin de technieken reeds bekend zijn bij de waterbeheerders;
- en kostenoverwegingen.

Op basis van deze criteria kon geconcludeerd worden dat met name de bioassays, de immunoassays en de HPLC/UV fingerprint in aanmerking zouden moeten komen voor vervolgonderzoek. Ook het criterium dat elk van deze technieken ingezet kan worden voor bestrijdingsmiddelenonderzoek was bij deze keuze van belang (voor veel andere parameters bestaan over het algemeen al enkele goede en goedkope technieken).

Specifiek commentaar bij enkele van de besproken technieken betrof het volgende:

- Om een goed beeld te kunnen krijgen van toxiciteit zou het in principe noodzakelijk zijn om meerdere bioassays (4 à 5), gebaseerd op organismen uit verschillende families, in te kunnen zetten.
- Ter verbetering van gevoeligheid en selectiviteit van de bioassaybepalingen, lijkt het aanbevelenswaardig om de mogelijkheden van een preconcentreringsstap te inventariseren<sup>7</sup>.
- De begeleidingscommissie twijfelt aan de extreem lage aantoonbaarheidsgrenzen, die voor de lasermicrobe-assay gepubliceerd zijn.
- Voor enzymassays (hoewel inzetbaar voor bestrijdingsmiddelenonderzoek) bestaat, op basis van slechte ervaringen met choline-esteraseremming, te weinig vertrouwen.

---

<sup>7</sup> Er dient echter rekening te worden gehouden met het feit dat de bepaling onder dergelijke omstandigheden niet langer betrekking heeft op totale toxiciteit, maar op de toxiciteit van de geëxtraheerde fractie.

- Voor de sensoren zijn nog te weinig interessante toepassingen uitontwikkeld.
- In verband met de beperkte inventarisatie van FIA systemen, kan op dit punt niet tot een solide uitspraak gekomen worden.

Algemeen werd geconcludeerd dat ook voor de geselecteerde technieken vooralsnog onvoldoende informatie beschikbaar is om direct een programma voor een tweede fase vast te stellen. Op basis van eigen verwachtingen m.b.t. aanvullend beschikbare informatie en haalbaarheid van vervolgonderzoek, werden derhalve de volgende specifieke methoden geselecteerd voor een beperkte aanvullende inventarisatie:

- Bioassays:
  - Testen op basis van *Daphnia magna* (kreeftachtige: watervlo); acute *Daphnia magna* en *Daphnia magna* Fluo-test.
  - Testen op basis van *Thamnocephalus* (kreeftachtige); Thomnotoxkit F en thamnotoxkit Fluo.
- Immunoassays:
  - Assay voor triazines (groepsspecifiek).
  - Assay voor fenylureum-herbiciden (groepsspecifiek).
  - Assay voor isoproturon (stofspecifiek).
  - Assay voor cyclodiënen (groepsspecifiek).
- Groepsparameters:
  - Bepaling van organische microverontreinigingen m.b.v. HPLC/UV fingerprinting.

Een beknopt overzicht van de resultaten van deze aanvullende inventarisatie is opgenomen in Hoofdstuk 7.



## 7 MOGELIJKHEDEN VOOR FASE 2

### 7.1 Inleiding

Voor de geselecteerde indicatieve analysetechnieken (zie hoofdstuk 6) zijn modules opgesteld die een overzicht geven van de voor deze technieken al bekende gegevens, de nog ontbrekende gegevens en de werkzaamheden die moeten worden uitgevoerd om een beeld te kunnen krijgen van deze ontbrekende gegevens en de prestaties van de technieken, inclusief de daaraan verbonden kosten. Detailinformatie uit deze modules is in de bijlagen van deze rapportage opgenomen (bijlagen 10 t/m 12). Deze bijlagen hebben betrekking op de volgende indicatieve analysetechnieken:

#### Bioassays (bijlage 10):

- IA acute daphnia magna en Daphnia magna Fluo-test (modelstof parathion);
- IB acute daphnia magna en Daphnia magna Fluo-test (modelstoffen parathion en dichloorvos);
- IIA thamnotoxkit F en thamnotoxkit Fluo-test (modelstof parathion);
- IIIB thamnotoxkit F en thamnotoxkit Fluo-test (modelstoffen parathion en dichloorvos).

#### Immunoassays (bijlage 11):

- I fenylureumherbicide assay (diverse modelverbindingen);
- II triazine assay (diverse modelverbindingen);
- III isoproturon assay (modelverbinding isoproturon);
- IV cyclodiënen assay (diverse modelverbindingen).

#### Groepsparameters (bijlage 12):

- I HPLC fingerprint (niveau 1);
- II HPLC fingerprint (niveau 3).

Hieronder volgt een beknopte beschrijving van de methoden die in de bijlagen zijn opgenomen.

### 7.2 Detectie van organofosforbestrijdingsmiddelen in oppervlaktewater met behulp van acute toxiciteitstesten met kreeftachtigen

De acute Daphnia magna test, of Daphnia magna Straus test (Cladocera, Crustacea) [ISO 6341, 1989], en de Daphnia magna Fluo-test (volgens het protocol van de Daphnia magna IQ-test [AquaSurvey, 1994]) worden uitgevoerd met de algemeen in het Nederlandse oppervlaktewater voorkomende watervlo Daphnia magna. De testorganismen worden blootgesteld aan verschillende concentraties in het te testen oppervlaktewater.

Bij de acute Daphnia magna test worden na 24 uur blootstelling per testconcentratie het aantal dode en immobiele dieren gescoord (immobiel = niet meer zwemmend, maar wel nog bewegende antennes). Uit deze testresultaten wordt de (effect)concentratie geschat die 50% immobilisatie (= immobiel + dood) geeft binnen 24 uur blootstelling (EC50).

Bij de Daphnia magna Fluo-test kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen, in tegenstelling tot de gezonde organismen, een speciaal fluorogeen substraat, dat na 1 uur aan het testmedium wordt toegevoegd, niet opnemen en/of metaboliseren. Vervolgens wordt per testconcentratie (na 15 minuten) het aantal fluorescerende organismen gescoord. Op basis

van de resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50).

De THAMNOTOXKIT F. [Creasel, 1992] en de THAMNOTOXKIT Fluo-test worden uitgevoerd met juvenielen van de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus*.

Uitvoering en eindpuntenevaluatie van de THAMNOTOXKIT F komen overeen met de acute *Daphnia magna* test. Uitvoering en eindpuntenevaluatie van de THAMNOTOXKIT Fluo-test komen overeen met de *Daphnia magna* Fluo-test.

Voor een uitvoeriger beschrijving van de uitvoering en de randvoorwaarden van de bovengenoemde testen wordt verwezen naar bijlage 10.

### **7.3 Detectie van herbiciden en cyclodiënen in oppervlaktewater met behulp van immunoassays**

De immunoassay voor de detectie van de groep van de fenylureumherbiciden (standaard chloortoluron) in water is een competitieve ELISA = Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. Het antilichaam is gecoat op de wanden van de putjes van de microtiterplaat. Voor de meting wordt een bepaalde hoeveelheid chloortoluron-enzymconjugaat toegevoegd tegelijkertijd met bekende hoeveelheden chloortoluron (standaard) of een onbekende hoeveelheid van een fenylureumherbicide in een te meten monster. Geconjugeerde en ongeconjugeerde chloortoluron zullen een competitie aangaan voor bindingsplaatsen op het antilichaam. Door, na incubatie wassen, chromogeen en enzymsubstraat toe te voegen wordt een kleuring verkregen die omgekeerd evenredig is aan de concentratie standaard of fenylureumherbicide. De assays voor isoproturon en cyclodiënen<sup>6</sup> zijn eveneens competitieve ELISA's; vergelijkbaar met die voor de fenylureumherbiciden. De cyclodiënen kit is echter, in tegenstelling tot die voor fenylureumherbiciden en isoproturon, kwalitatief. Bovendien zijn bij deze kit de standaardconcentraties relatief hoog, zeker wanneer het bedoeling is in watermonsters te meten. Omdat echter voor het maken de standaardcurve een stockoplossing met chloordaan in de kit wordt geleverd, kan naar eigen inzicht en behoefte een standaardcurve gemaakt worden over een ander concentratiebereik.

De immunoassay voor de detectie van triazines is ontworpen voor de detectie van atrazine. Door de kruisreactiviteiten is de kit echter specifiek voor meerdere triazineverbindingen. Ook deze assay is een competitieve ELISA waarbij het antilichaam echter is gecoat op magnetiseerbare deeltjes. Na incubatie worden de ongebonden stoffen verwijderd door de aan de deeltjes gebonden fractie neer te slaan met behulp van een sterke magneet en de bovenstaande vloeistof te verwijderen. Op de gebonden fractie wordt een enzym-kleur-reactie uitgevoerd.

Voor een uitvoeriger beschrijving van de uitvoering en de randvoorwaarden van de bovengenoemde testen wordt verwezen naar bijlage 11.

---

<sup>6</sup> Waaronder endosulfan, endrin, dieldrin, aldrin, chloordaan en heptachloor.

#### 7.4 Screening van 'PLRP-s' extraheerbare apolaire tot polaire verbindingen in oppervlaktewater met behulp van HPLC in combinatie met UV of DAD detectie

Met de HPLC/UV-fingerprint bepaling (HPLC-UV niveau 1) worden alle apolaire tot polaire verbindingen zichtbaar gemaakt (die met een a-specifiek adsorbens als het polymeer 'PLRP-s' geëxtraheerd worden) die bij de geselecteerde golflengte (in de range 230-260 nm) UV-adsorptie vertonen. Door gebruik te maken van HPLC als scheidingstechniek kan een onderscheid gemaakt worden tussen natuurlijke 'humeuze' stoffen en '(waarschijnlijk) antropogene' stoffen.

Als aanvulling kan bij de HPLC/DAD doelstof-analyse (HPLC-DAD niveau 3) tevens de UV-spectra van de componenten worden opgenomen ter vergelijking met bibliotheek-spectra. Voor de "geïdentificeerde" componenten kan bovendien kwantitatieve informatie m.b.t. de concentratie verkregen worden.

Beide aanpakken maken gebruik van dezelfde analysegang (één methode) waarbij de procedure, gebruikmakend van een groot-volume autosampler en on-line gekoppeld SPE/HPLC, volledig geautomatiseerd wordt uitgevoerd.

Voor een uitvoeriger beschrijving van de uitvoering en de randvoorwaarden van de bovengenoemde testen wordt verwezen naar bijlage 12.

#### 7.5 Conclusie

Op basis van de in deze rapportage neergelegde gegevens, alsmede op basis van informatie m.b.t. de kosten voor tijdens fase twee uit te voeren onderzoek, is gekozen voor een continuering van het onderzoek voor de in paragraaf 7.3 beschreven immunoassay-methoden en de in paragraaf 7.4 beschreven HPLC-UV/DAD methoden.

Vervolgonderzoek voor de bioassaytechnieken komt daarmee te vervallen. De volgende argumenten waren daarbij van doorslaggevend belang:

- De procedure, die voor vervolgonderzoek met de bioassaytechnieken noodzakelijk zal zijn (o.a. preconcentrerend nodig voor het verbeteren van aantoonbaarheidsgrenzen), wordt als omslachtig ervaren. Dit met name gezien het feit dat de kosten voor het uitvoeren van een bepaling in dezelfde orde van grootte zullen liggen als voor de meeste momenteel gehanteerde technieken.
- Er is onvoldoende zekerheid m.b.t. de betrouwbaarheid van de resultaten die met de bioassaytechnieken zullen worden verkregen.
- Tot slot vormde het feit dat bioassays, als instrument voor het bepalen van "totale toxiciteit", al onderdeel uitmaken van een parallel lopend Stowa project (thema 15: "Biomonitoringstechnieken voor bestrijdingsmiddelen en zware metalen in watersystemen") een belangrijk argument.



## Referenties

- Ache H.J. Chemical microsensors and microanalysers; essential components of microsystems, *Interdisciplinary Sci. Rev.*, 18 pp.280-288, 1993.
- Adriaanse, M.; H.A.G. Niederländer en P.B.M. Stortelder. Monitoring water quality in the future; part A-1: chemical monitoring -draft- RIZA, Lelystad, 1995.
- Aquasurvey, Inc. Ceriodaphnia dubia IQ Toxicity Test Kit\* instructions. Flemington, U.S.A, 1993.
- AquaSurvey. Daphnia IQ Toxicity test KIT Instructions. 1994.
- AWWA/Kiwa. The search for a surrogate -cooperative research report-. Kiwa, Rijswijk, 1988.
- Beenackers, M.. Immuno-assays in de milieu-analyse zijn klaar voor een interessante competitie; *Laboratorium Praktijk* maart: pp.119-122, 1995.
- Benjamini, E. *Immunology: A Short Course*; 2nd ed.; Wiley-Liss, New York, 1991.
- Beveren, J. van and A. Noordsij. Isolatie van organische verbindingen uit water met behulp van XAD. KIWA rapport SWE-258, 1981.
- Bier, F.F.; R Jockers; R.D. Schmid. Integrated optical Immunosensor for s-Triazine Determination: Regeneration, Calibration and Limitations. *Analyst* 119: pp.437-441, 1994.
- Billings C.; M. Lane; A. Watson; T.P. Whitehead and G. Thorpe. A rapid and simple chemiluminescent assay for water quality monitoring, *Analysis*, 22 pp.27-30, 1994.
- Bitton, G., M. Campbell & B. Koopman. MetPAD: A Bioassay Kit for the Specific Determination of Heavy Metal Toxicity in Sediments from Hazardous Waste Sites. *Environmental Toxicology and Water Quality* 7, 1991.
- Bitton, G., B. Koopman & O. Agami. MetPAD<sup>®</sup>: a bioassay for rapid assessment of heavy metal toxicity in wastewater. *Water Environment Research* 64 (6): pp.834-836, 1992.
- Bitton, G., K. Jung & B. Koopman. Evaluation of a microplate assay specific for heavy metal toxicity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 27: pp.25-28, 1994.
- Briggs, R. In-situ water quality sensors: a review, In WMO technical reports in hydrology and water resources: *Advances in water quality monitoring*; report of a WMO regional workshop, WMO/TD - No 612, WMO, Geneva, Switzerland pp.156-167, 1994.
- Brouwer, E. On-line trace enrichment in column liquid chromatography for the determination of organic micropollutants in surface water; *Dissertatie*. Vrije Universiteit, Amsterdam, 1995.



## Referenties, vervolg

Byfield M.P. and R.A. Abukneska. Biochemical aspects of biosensors, *Biosensors & bioelectronics*, pp.373-400, 1994.

Calleja, M.C.; G. Persoone and P. Geladi (submitted). Comparative acute toxicity of the first 50 MEIC chemicals to aquatic non-vertebrates. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*.

Catty, D. *Antibodies*, Vol. I and II; IRL Press, Oxford, 1989.

Centano, M.D.F.; G. Persoone and P. Goyvaerts (in press). Cyst-based toxicity tests IX. The potential of *Thomnocephalus platyurus* as test species in comparison to *Streptocephalus proboscideus* (Crustaceae: Branchiopoda: Anostraca). *Environmental Toxicology and Water Quality*.

Creasel. ARTOXKIT M\*. *Artemia* toxicity screening test for estuarine and marine waters, standard operational procedure. V071090, 1990.

Creasel. THAMNOTOXKIT F. Crustacean toxicity screening test for freshwater, standard operational procedure. V241092. 1992.

Dennison, M.J. and A.P.F. Turner. Biosensors for environmental monitoring; *Biotech. Adv.* 13: pp.1-12, 1995.

Dominiquez E. and F. Ortega. Development of a biosensor detection system for model phenols based on commercially available enzymes, In: Bennetto P. and Busing J., *Proceedings of the second European workshop on Biosensors for environmental monitoring, held within the EC Environment Programme (1991-1994), Area II.1. Assessment of environmental quality an monitoring.* EC DG XII, Brussels pp.84-90, 1994.

Dzydevich S.V.; A.A. Shulga; A.P. Soldatkin; A.M. Nyamsi-Hendji; N. Jaffrezic-Renault and C. Martelet. Conductometric biosensor based on cholinesterases for sensitive detection of pesticides, *Electroanalysis*, pp.752-758, 1994.

EBPI. Infofolder ToxiChromoCheck.

ECHA Microbiology Ltd. The ECHA Biocide Monitor.

ECHA Microbiology Ltd. Informatiepakket.

Felkner, C.; B. Worthy, T. Christison, C. Chaisson, J. Kurtz and P.J. Wyatt. Laser-microbe bioassay system, *Aquatic toxicology and hazard assessment* vol. 12, ASTM STP 1027, Cowgill, U.M. & L.R. Williams. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, U.S.A.:95-103, 1989.

Flentge, E. Milieulaboratorium De Punt, persoonlijke mededeling juni 1995

## Referenties, vervolg

Flores J.R. and E. Lorenzo. In: *Comprehensive Analytical Chemistry*, Smith M.R. and Vos J.G. (Eds.), Elsevier: Amsterdam, the Netherlands.

Guibault G.G. *Analytical uses of immobilized enzymes*, Marcel Dekker inc., New York, 1984.

Günther A. and U. Bilitewski. Characterisation of inhibitors of acetylcholinesterase by an automated amperometric flow-injection system, *Anal. Chim. Acta*, 300 pp.117-125, 1995.

Guzzella, L. and S. Galassi. Chemical and toxicological characterization of river water extracts with the *Vibrio fischeri* photobacterium. *The Science of the Total Environment, Supplement 1993*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam: pp.1217-1221, 1993.

Hoogendoorn E.A. and P. van Zoonen. Coupled column reversed-phase liquid chromatography in environmental analysis. *J. of Chrom.* 703 pp.149-166, 1995

Hunter, W.M.; J.E.T. Corrie. *Immunoassays for Clinical Chemistry*, 2nd ed.; Churchill Livingstone, Edinburgh, 1983.

ISO 6341. Water Quality Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO, Geneva, Switzerland, 1989a.

ISO 9562. Water quality - Determination of adsorbable organic halogens (AOX). ISO, Genève (CH), 1989b.

ISO 11369. Determination of selected plant treatment agents after solid-liquid extraction, high performance liquid chromatography (HPLC) and UV-detection" (CD-draft), ISO/TC 147/SC2, Berlin, 1995.

Jager M.E. Geïmmobiliseerde enzym reactoren (IMER's) voor de bepaling van bestrijdingsmiddelen; Doctoraalscriptie algemene en analytische chemie. Vrije Universiteit, Amsterdam, 1995.

Janssen, C.R. and G. Persoone. Rapid toxicity screening tests for aquatic biota. 1. Methodology and experiments with *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* (12): pp.711-717.

Jantra J. *Chemical Sensors*, *Anal. Chem.*, 64 pp.196R-219R, 1992.

Jantra J.; M. Josowicz and D.M. DeVaney. *Chemical Sensors*, *Anal. Chem.*, 66 pp.207R-228R, 1994.

Karlberg B. and G.E. Pacey. *Flow injection analysis - a practical guide, Techniques an instrumentation in analytical chemistry: Vol 10*. Elsevier, Amsterdam, 1989.

Kress-Rogers E. (ed.). *Instrumentation and sensors for the food industry*; Butterworth-Heinemann, Oxford, 1993.

## Referenties, vervolg

Kwan, K.K. Direct toxicity assessment of solid phase samples using the Toxi-Chromotest Kit. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8: pp.223-230, 1993.

Lam S. and G. Malikin (Eds.), *Analytical applications of immobilized enzyme reactors*, Chapman & Hall, London, 1994.

Lange, J.H. de. *Bio-assays: Literatuurstudie naar de bruikbaarheid*. Oranjewoud, Heerenveen, 1994.

Lange. LUMIStox lichtbacteriën toets.

LBRAP, Laboratory for Biological Research and Aquatic Pollution. Voorlopige 'randvoorwaarden'. Wetenschappelijke Publikatie Rijksuniversiteit Gent, 1995.

Leeuwis H.; F.J. Markerink and D.J. Sprangers. *Inventarisatie Milieumeettechnieken; onderzoek naar analyse- en detectietechnieken voor milieubeheer*, Twente Technology Transfer (3T) in opdracht van het Ministerie van Economische Zaken, Enschede, 1990.

Loon, W.M.G.M. van and J.L.M. Hermens. *Monitoring water quality in the future; part B: mixture toxicity parameters - draft -*, RITOX, Utrecht, 1995.

Lynggaard-Jensen A. *Sensors for water quality and their potential*, In WMO technical reports in hydrology and water resources: *Advances in water quality monitoring; report of a WMO regional workshop*, WMO/TD - No 612 pp.168-181, WMO, Geneva, Switzerland, 1994.

Maas, J.L.; C. van de Guchte and F.C.M. Kerkum. *Methodebeschrijvingen voor de beoordeling van veronreinigde waterbodems volgens de TRIADE benadering. Methodebeschrijving voor enkele bioassays, bioaccumulatiemetingen en veldstudies*. Rijksinstituut voor Zuivering van Afvalwater RIZA. Notanr. 93.027, 1993.

Marco-Varga G.; Emnéus J. and Burestedt E. *Biosensors for the detection of phenolic compounds*, In: Bennetto P. and J. Büsing. *Proceedings of the second European workshop on Biosensors for environmental monitoring, held within the EC Environment Programme (1991-1994), Area II.1. Assessment of environmental quality and monitoring*. EC DG XII, Brussels pp.78-83, 1994a.

Marco-Varga G. and J. Emnéus, *On line monitoring of waste waters with sampling and sample handling techniques*. In: Bennetto P. and J. Büsing. *Proceedings of the second European workshop on Biosensors for environmental monitoring, held within the EC Environment Programme (1991-1994), Area II.1. Assessment of environmental quality and monitoring* EC DG XII, Brussels, pp.182-186, 1994b.

## Referenties, vervolg

Marty J.L. and Mionetto, Development of new biosensors and improvement of existing sensors by means of a 'smart sensor' concept - applications to aquatic media, In: Bennetto P. and Büsing J., Proceedings of the second European workshop on Biosensors for environmental monitoring, held within the EC Environment Programme (1991-1994), Area II.1. Assessment of environmental quality an monitoring. EC DG XII, Brussels pp.33-38, 1994.

McArdle, F.A. and K.C. Persaud. Analyst 118: pp.419-423, 1993.

Meulenberg, P.; Immunoassays: Toepassing in Waterkwaliteitsonderzoek; Rapport ELTI Support, 1992.

Meulenberg, P.; P. Stoks and W.H. Mulder; Application of Immunoassays for water quality research. H2O 26: pp.588-593, 1993.

Meulenberg E.P.; W.H. Mulder and P.G. Stoks. Immunoassays for Pesticides; Environ. Science Technol. 29: pp.553-561, 1995.

Meulenberg, E.P. and P.G. Stoks. Water quality control in the production of drinking water from river water: The application of immunological techniques; Anal. Chim. Acta; in press.

Minnuni, M.; P. Skladal and M. Mascini. A piezoelectric quartz crystal biosensor as a direct affinity sensor; Anal. Lett. 27: pp.1475-1487, 1994.

Mittenzwey K.-H. Portable water quality monitoring equipment; the current situation, In WMO technical reports in hydrology and water resources: Advances in water quality monitoring; report of a WMO regional workshop, WMO/TD - No 612, WMO, Geneva, Switzerland, 1994.

Mulder, M.A.A.J. Interpretatie en vergelijk van ecotoxicologische toetsen voor urgentie bepaling van saneringsonderzoek in enkele regionale wateren in Noord-Holland. RIZA Werkdocument nr. 93.145X pp.43, 1993.

Nalecz-Jawecki; K. Demkowicz-Dobrzanski and J. Sawicki. Protozoan Spirostomum ambiguum as a highly sensitive bioindicator for rapid and easy determination of water quality. The Science of the Total Environment, Supplement 1993. Elsevier Science Publishers BV., Amsterdam.

NEN 6401. Water - bepaling van het halogeengehalte van vluchtige organohalogeenvverbindingen (VOX). NNI, Delft, 1991a.

NEN 6402. Water - bepaling van het halogeengehalte afkomstig van niet-vluchtige, met petroleume-ther extraheerbare organohalogeenvverbindingen (EOX). NNI, Delft, 1991b.

Niessner R. Trends Anal. Chem., 10 pp.310-316, 1991.

## Referenties, vervolg

Noij, Th.H.M.; A. Noordsij en J. van Genderen. Drinkwater uit Oppervlaktewater. Kiwa Mededeling 107, Nieuwegein, 1989a.

Noij, Th.H.M.; A. Noordsij en J. van Genderen. Drinkwater uit Oppervlaktewater -meetresultaten-, Kiwa Mededeling 108, Nieuwegein, 1989b.

Noij, Th.H.M. en A. Brandt. HPLC with on-line solid phase extraction for the trace analysis of polar pesticides" in H.-J. Stan (ed.). Analysis of pesticides in ground and surface water II. Springer-Verlag, Berlin, 1995

Noordsij, A. Organische stoffen in (drink)water. Kiwa-mededeling (in voorbereiding), Nieuwegein, 1995.

NVN 6516. Water - Bepaling van de acute toxiciteit met behulp van Photobacterium phosphoreum. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, augustus 1993.

Obst, U. and A. Holzapfel-Pschorn. Enzymatische Tests für die Wasseranalytik. Oldenburg Verlag, München, pp.83-86, 1988.

Obst, U. Enzymatische tests für die Wasseranalytik: 2. Auflage. Oldenburg Verlag, München, pp.124-147, 1995.

Olson, B.H. and Y.L. Tsai. In: Environmental Microbiology, Mitchell R. (Ed.), pp.239-63 Wiley: New York, 1992.

Olthuis, W. Chemical sensing in freshwater - problems and opportunities, In: Walley W.J. and Judd S. (Eds.), River water quality - monitoring and control, proceedings of the freshwater Europe symposium, Birmingham, 1993.

Oort, R.C. Evaluatie ISFET sensoren, Werkdocument GWIO-93.415X, Hydro-instrumentatie, RIKZ Rijswijk, 1993.

Persoone, G.; M. Goyvaerts; C. Janssen; W. de Coen and M. Vangheluwe. Cost-effective acute hazard monitoring of polluted waters and waste dumps with the aid of toxkits. University of Ghent, Laboratory for Biological Research and Aquatic Pollution. Commission of the European Communities Contract ACE 89/BE 2/D3, 1993.

Persoone G.; C. Janssen; W. de Coen and M. Latif. Cyst-based toxicity tests XI: comparison of the sensitivity of the acute Daphnia magna test and two crustacean microbiotests for chemicals and wastes. Submitted to Chemosphere.

Pichon, V. and M.-C. Hennion. Determination of pesticides in environmental waters by automated on-line trace-enrichment and liquid chromatography. J. of Chrom. 665 pp.269-281, 1994.

## Referenties, vervolg

Quist, J. Optische sensoren voor de bepaling van de waterkwaliteit. RIKZ rapport 94.047, Den Haag, 1994.

Roitt, I. Essential Immunology, 6th ed.; Blackwell Scientific Publ., Oxford, 1988.

Sandberg, R.G., et al. Biosensor design and application, ACS Symposium Series 511; Mathewson, R.R., Finley, J.W., eds.; American Chemical Society, Washington, D.C., pp.81-88, 1992.

Schnitzler M. and H. Sontheimer. Eine Methode zur Bestimmung des gelösten organisch gebundenen Schwefels in Wässern (DOS), Vom Wasser 59 pp.159-167, 1982

Schwedt, G. and K. Stein. Labor Praxis, jan.:16, 1992.

Schwedt, G. and K. Stein. Pestizid-Biosensor für die Wasserüberwachung, Umweltanalytik.

Sethi R.S. Transducer aspects of biosensors, Biosensors & Bioelectronics, 9, pp.243-264, 1994.

Slobodnik, J.; M.G.M. Groenewegen; E.R. Brouwer; H. Lingeman and U.A.Th. Brinkman. Fully automated multi-residue method for trace level monitoring of polar pesticides by liquid chromatography. J. of Chrom. 642 pp.359-370, 1993.

Solsky R.L. Ion-selective electrodes, Anal. Chem., 62 pp.21R-33R, 1990.

Sprangers D.J.; H. Leeuwis and A.A. Dijk van. Milieusensoren; inventarisatie van technologische, markttechnische en infrastructurele aspecten, Centrum voor Micro Electronica (CME) in samenwerking met Twente Technology Transfer (3T), Enschede, 1992.

Stein, K., G. Schwedt. Vom Wasser 79:225ff, 1992.

Toussaint, M.W.; T.R. Shedd; W.H. van der Schalie and G.R. Leather. A comparison of standard acute toxicity tests with rapid-screening toxicity tests. Environmental Toxicology and Chemistry vol. 14, no. 5, pp.907-915, 1994.

Tran Minh Canh (ed.). Biosensors; Chapman & Hall, Londen, 1993.

Turner, A.P.F. (ed.). Advances in Biosensors, Vol. 1; JAI Press Ltd., Londen, 1991.

Turner, A.P.F. (ed.). Advances in Biosensors, Vol. 2; JAI Press Ltd., Londen, 1992.

Uden, P.C. Element-specific chromatographic detection by atomic absorption, plasma atomic emission and plasma mass spectrometry. J. of Chrom. 703 pp.393-416, 1995.

Vaihinger S. and W. Goepel. Sensors, Goepel W., Hesse J. and Zemel J.Z. (Eds.), VCH: Part 1, pp.191-237 Weinhiem, Germany, 1991.

## Referenties, vervolg

Verhaar H.J.M.; W.M.G.M van Loon; F.J.M. Busser; E. Smit and J.L.M. Hermens. Development of parameters for evaluating the effects of mixtures of organic micro-pollutants on the environment, RITOX rapport 94.001, Utrecht, 1994.

Willemsen, A.; M.A. Vaal; D. de Zwart. Microbiotests as tools for environmental monitoring. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieuhygiene RIVM Rapport 607042005, De Bilt, 1995.

Wittmann C. and R.D. Schmid. Development and application of an automated quasi continuous immunoflow injection system to the analysis of pesticide residues in water and soil. In: J. Agr. Food Chem. 42, pp.1041-1047 (and references therein), 1994.

Wollenberger U.; B. Neumann; K. Riedel and Schneller. Enzyme and microbial sensor for phosphate, phenols, pesticides and peroxides, Fresenius J. Anal. Chem., 348 pp.563-566, 1994.

Wong, R.B.; N. Anis and M.E. Eldefrawi. Reusable fiber-optic-based immunosensor for rapid detection of imazethapyr herbicide; Anal. Chim. Acta 279: pp.141-147, 1993.

Wylie, P.L. and B.D. Quimby. Application of gas chromatography with an atomic emission detector. J. of HRC 12 pp.813-818, 1989.

Yamauchi S. (ed.). Chemical sensor technology, Kodansha Ltd.: Vol. 4. Tokyo Japan, 1991.

Zieseniss, K. and E. Grabert. A novel method for determining chronic toxicity with the Lumistox luminescent bacteria test. In: Campbell, A.K., L.J. Kricka & P.E. Stanley. Bioluminescence and Chemiluminescence. Fundamentals and applied aspects. Proceedings of the 8th International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence, Cambridge, 1994.

## Afkortingen

AAS	Atomaire Absorptie Spectroscopie
AED	Atomaire Emissie Detectie
AMK	Algemene Milieukwaliteit
AOAC	American Organisation of Analytical Chemistry
AON	Adsorbeerbare Organische Stikstofverbindingen
AOP	Adsorbeerbare Organische Fosforverbindingen
AOS	Adsorbeerbare Organische Zwavelverbindingen
AOX	Adsorbeerbare Organische Halogenen
BAW	Bulk Acoustic Wave
BZV	Bio-chemisch Zuurstof Verbruik
CZV	Chemisch Zuurstof Verbruik
DAD	Diode Array Detection
EC50	Meer algemeen EC##; Concentratie die een vooraf bepaald effect levert voor ##% van de geobserveerde populatie.
ELISA	Enzyme Labeled Immuno Sorbent Assay
ENW	Evaluatie Nota Water
EON	Extraheerbare Organische Stikstofverbindingen
EOP	Extraheerbare Organische Fosforverbindingen
EOS	Extraheerbare Organische Zwavelverbindingen
EOX	Extraheerbare Organische Halogenen
EU	Europese Unie
FIA	Flow Injectie Analyse
GC	Gas Chromatografie
Hhs-RL	Hoogheemraadschap van Rijnland
Hhs-US	Hoogheemraadschap van Uitwaterende Sluizen in Hollands Noorderkwartier
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IMER	gelMmobiliseerde Enzym Reactor
ISE	Ion Selective Electrode
ISFET	Ion Selective Field Effect Transistor
ISO	Internationale Organization for Standardization
LOEC	Lowest Observable Effect Concentration
MILBOWA	Milieukwaliteitsdoelstellingen Bodem en Water
MOSFET	Metal Oxidified Surface Field Effect Transistor
OSn	Organotin
PAK	Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen
PCB	Poly Chloor Bifenylen
PLRP-S	Polimeric Refersed Phase-Sorbent
ppb	part per billion
SAMOS	System for the Automated Measurement of Organic contaminants in Surfacewater
SAW	Surface Acoustic Wave
SFE	Supercritical Fluid Extraction
SPR	Surface Plasmon Resonance
US/EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	Ultra Violet (detectie)



## Afkortingen, vervolg

VON	Vluchtige Organische Stikstofverbindingen
VOP	Vluchtige Organische Fosforverbindingen
VOS	Vluchtige Organische Zwavelverbindingen
VOX	Vluchtige Organische Halogenen
Ws-RD	Waterschap Regge & Dinkel
XON	XAD-hars extraheerbare Organische Stikstofverbindingen
XOP	XAD-hars extraheerbare Organische Fosforverbindingen
XOS	XAD-hars extraheerbare Organische Zwavelverbindingen
XOX	XAD-hars extraheerbare Organische Halogenen
Zs-WO	Zuiveringschap West-Overijssel

Tabel I

Waterbeheerder: Database (zie voetnoot):	Rijnland USHN				Rijnland USHN		
	B	A	A		B	A	A
<b>Basisvariabelen:</b>				<b>Fenolen (vervolg):</b>			
baseverbruik pH 8,5		1		3 chloorfenol		1	
biochemisch zuurstofverbruik		1	2	3,4 dichloorfenol		1	
chemisch zuurstofverbruik		2		3,4,5 trichloorfenol		2	
detergenten anion		1		3,5 dichloorfenol		1	
doorzicht/helderheid		1	2	4 chloor - 3 methyl fenol		1	
geur		1	2	4 chloorfenol		2	
hardheid		1		fenolen gechloreerd		1	
humus		1		pentachloorfenol	2	2	2
kleur		1	1	waterdamp vluchtige fenolen		2	2
zuurstof		2					
olie		2	2	<b>Organische halogeenvervindingen:</b>			
onopgeloste Bestanddelen			2	dichloorethaan, (1,1-)			1
pH		2	2	trichloorethaan (1,1,1,-)			1
temperatuur		2	2	trichloorethaan (1,1,2-)			1
troebelings			2	dichloorethaan (1,2-)			1
ureum stikstof		1		aniline (2-chloor)		1	
verticale extinctie coef.		1		aniline (2,3-dichloor)		1	
vuil		1		aniline (2,4-dichloor)		1	
zicht		1		aniline (2,4,5-trichloor)		1	
zwevend stof		2		aniline (2,6-dichloor)		1	
zuurverbruik pH 4,2		1		aniline (3-chloor)		1	
				aniline (3,4-dichloor)		1	
				aniline (3,5-dichloor)		1	
				aniline (4-chloor)		1	
<b>Macro-ionen:</b>				adsorbeerbare organische halogenen		1	
calcium		1	1	arom amines gechloreerd		1	
chloride		2	2	broomdichloormethaan		1	
elektrisch geleidend vermogen		2	2	chloorbenzeen		1	
kaliüm		1	2	dichlooretheen (cis-1,2-)			1
magnesium		2	2	dibroomchloormethaan		1	
waterstofcarbonaat		2	2	dichloormethaan		1	
natrium		2	2	dichloormethaan			1
carbonaat			2	dichloorpropaan	1	1	1
silicaat/silicium		2	1	extraheerbare organische halogenen			2
sulfaat		2	2	pentachloorbenzeen			1
				tetrachlooretheen		1	1
<b>Nutrienten:</b>				tetrachloormethaan		1	1
chlorofyl-a		2	2	tribroommethaan		1	
kjeldahl stikstof		2	2	trichlooretheen		1	1
nitriet + nitraat		2	2	trichloormethaan		1	1
ortho fosfaat		2	2	vluchtige organische halogenen		2	
totaal fosfor		2	2				
ammonium stikstof		2	2				
totaal stikstof			2				
nitraat			1	<b>(Polycyclische) Aromatische Koolwaterstoffen en PCF</b>			
nitriet		2	2	acenafteen	2	1	
phaeofytine		1		acenaftyleen	2	1	
				anthraceen	2	1	
<b>Zware metalen:</b>				benzeen	1	1	
aluminium		1		benzo(a)anthraosen	2	2	
arsen		2	2	benzo(a)pyreen	2	2	
cadmium		2	2	benzo(b)fluorantheen	2	2	
chrom		2	2	benzo(ghi)peryleen	2	2	
ijzer (totaal)		2	2	benzo(k)fluorantheen	2	2	
koper		2	2	chryseen	2	2	
kwik		2	2	dibenz(a,h)anthraceen	2	2	
lood		2	2	ethylbenzeen	1	1	
nikkel		2	2	fenantreen	2	1	
zink		2	2	fluorantheen	2	2	
				fluoreen		1	
<b>Fenolen:</b>				indeno(1,2,3-cd)pyreen	2	2	
2 chloorfenol		1		naftaleen	2	1	
2,3 dichloorfenol		1		PAK (totaal)	2		
2,3,4 trichloorfenol		2		pyreen	2	2	
2,3,4,5 tetrachloorfenol		2		styreen	1		
2,3,4,6 tetrachloorfenol		2		tolueen	1	1	
2,3,5 trichloorfenol		2		xyleen	1	1	
2,3,5,6 tetrachloorfenol		2		PCB (28,52,101,118,138,153,180) ind.	1	1	
2,3,6 trichloorfenol		2		PCB totaal	2		
2,4 dichloorfenol		2					
2,4,5 trichloorfenol		1		<b>Bestrijdingsmiddelen:</b>			
2,4,6 trichloorfenol		1		zie volgende pagina			
2,5 dichloorfenol		1					
2,6 dichloorfenol		1					

Tabel I

Waterbeheerder: Database (zie voetnoot):	Rijnland USHN				Rijnland USHN		
	B	A	A		B	A	A
<b>Bestrijdingsmiddelen:</b>				<b>Gehalogeneerde bestrijdingsmiddelen (vervolg):</b>			
1,2 D		1		hexachloor-cyclohexaan (alfa)	2	2	1
2,4 D	1	1		hexachloor-cyclohexaan (beta)	2	1	1
acefaat	2			hexachloor-cyclohexaan (gamma)	2	2	2
aldicarb	1	1		hexachloor-cyclohexaan (delta)	1	1	
aldicarb-sulfon	1			heptachloor	2	1	1
aldicarb-sulfoxide	1			heptachloorepoxyde	2	1	1
atrazine	2	1		Isodrin			1
azinphos ethyl	1	1		quintozen / pcnb	2	1	
captan	2	2		tefodrin			1
carbendazim	2	1					
carbofuran	2						
chloorprofam	1	1					
chloorthalonil	1						
chloridazon	1	1					
choline-esteraseremming	2	2	2				
desethyl atrazine	1						
dichloorvos	1	1					
dimethoaat	2	1					
dinoseb	1	1					
dinoterb	1	1					
dnoc	1	1					
etu		1					
fentinacetaat-hydroxide		1					
furalaxyl	1						
hti	1						
linuron	1						
malathion	1	1					
mcpa	1	1					
mecoprop / mcpp	1	1					
metazachloor	1						
methamidophos	1						
methylisothiocyanaat	1	1					
mevinfos cis	1	1					
mevinfos trans	1	1					
monolinuron	1						
oxamil (+ oxim)	1						
parathion	1	1					
prochloraz	1	1					
propoxur	2						
smazine	2	1					
thiram zineb	1	1					
toctofos-methyl	1	1					
vindozolin	2	1					
<b>Gehalogeneerde bestrijdingsmiddelen:</b>							
aldrin	1	2	1				
ddd	2	2					
ddd (para-para)	1		1				
ddd (ortho-para)			1				
dde	2	2					
dde (para-para)			1				
dde (ortho-para)			1				
ddt	2	2					
ddt (para-para)	1		1				
ddt (ortho-para)			1				
dichlobenil	2	2					
dicofol		1					
dieldrin	2	2	1				
endosulfan a	2	2	1				
endosulfan b	2	1					
endrin	2	2	1				
hexachloorbenzeen	2	1	1				

**Voetnoots:**

- A Milbowa variabelen
- B Speciaal programma bestrijdingsmiddelen

1 Maakt deel uit van de database.  
 2 Maakt deel uit van de database en is, op basis van gestelde criteria, meegenomen in de correlatie-analyse.

## BIOASSAYS

In deze bijlage wordt een aantal bioassays/microbiotesten beschreven. Tabel 1.1 toont een overzicht.

Tabel 1.1 Overzicht van de in deze bijlage opgenomen bioassays en microbiotesten

Organisme	Naam
alg	Selenastrum ATP
bacterie	ATP-tox system Bacterie exo-enzym assay ECHA Biocide Monitor Laser/Microbe Bioassay System Lumistox 30 min MetPAD MetPLATE Microtox 15 min Microtox 30 min Microtox 5 min Microtox solid-phase Polytox Sediment-Chromotest/Toxi-ChromoPad Streptocephalus IQ Toxi-ChromoCheck Toxi-Chromotest (pH 5.5) Toxi-Chromotest (pH 7.5) Vibrio harveyi direct Vibrio harveyi growth
eencellige	Spirostomum ambiguum (Protoxkit F)
kreeftachtige	Artoxkit M IQ-test <sup>1</sup> Artemia salina IQ-test Ceriodaphnia dubia IQ-test Daphnia magna IQ-test Mysidopsis bahia ISO 6341 (acute watervlooiëntest) Thamnotoxkit F Thamnotoxkit Fluo
raderdier	Brachionus exo-enzym assay Rotoxkit F Rotoxkit M Rotoxkit M brakwater

<sup>1</sup>De aanduiding IQ-test is een term die gehanteerd wordt voor commercieel toegankelijke toxiciteitstesten, waarbij acute toxiciteit bepaald wordt op basis van de afnamen van specifieke enzymactiviteit. Daarbij wordt gebruik gemaakt van een fluorogeen substraat dat uitsluitend kan worden omgezet in een fluoriserende verbinding door organismen waarbij het betreffende enzymstelsel niet is aangetast door toxische stoffen.

## Bijlage 1

### BIOASSAY OP BASIS VAN ALGEN: SELENASTRUM ATP

#### 1. Principe

In deze test worden algen (*Selenastrum capricornutum*) van exponentieel groeiende culturen in microplates met continue belichting in een incubator gezet. Na 4 uur kan de ATP concentratie worden bepaald a.d.h.v. de luminescentie, waarschijnlijk na cel-lysis en luciferin-luciferase toevoeging. Toepassingsgebied, gevoeligheid, performance, e.d. zijn ten dele bekend [Willemsen et al. (1995)].

#### 2. Doelverbindingen

Afhankelijk van het type testorganisme (klasse, orde, familie, soort) dat gehanteerd wordt en het effect dat gemeten wordt, kunnen vele verschillende typen verbindingen een toxisch effect teweeg brengen. Veelal is het volledige scala aan verbindingen, die tot een toxisch effect kunnen leiden bij een specifiek organisme, niet bekend. Derhalve, is het veelal alleen mogelijk om een uitspraak te doen over die verbindingen waarvoor de toxische werking, bij een specifiek organisme, proefondervindelijk is vastgesteld. Voor de Selenastrum ATP test is met name de gevoeligheid voor een aantal zware metaalionen uitgetest. Het totale pakket van verbindingen waarvoor de test kan worden toegepast zal echter aanmerkelijk breder zijn. Hieronder wordt uitsluitend ingegaan op de prestaties van de test die uit experimentele resultaten konden worden afgeleid.

#### 3. Gevoeligheid en performance

Voor de verbindingen, waarvoor de gevoeligheid van de Selenastrum ATP test experimenteel werd vastgesteld, werden de volgende resultaten verkregen (tabel 1.2).

Tabel 1.2 Gevoeligheid en performance

Verbinding	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )
Zware metalen:	
Cadmium ( $\text{Cd}^{++}$ )	660
Chroom ( $\text{Cr}^{++}$ )	81
Koper ( $\text{Cu}^{++}$ )	90
Kwik ( $\text{Hg}^{++}$ )	590
Zink ( $\text{Zn}^{++}$ )	159

Voor veel bioassays gelden specifieke eisen voor het medium waarin de test uitgevoerd wordt (pH,  $\text{O}_2$ ,  $\text{NO}_2^-$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NH}_3$ ,  $\text{Cl}^-$ , e.d.). Dergelijke gegevens zijn voor de Selenastrum ATP test onbekend.

#### 4. Commerciële toegankelijkheid

De test is niet commercieel verkrijgbaar.

## BIOASSAYS OP BASIS VAN BACTERIËN

### 1. Principe

Hieronder wordt voor elk van de bacterie-assays uit tabel 1.1 een korte beschrijving gegeven. Daarbij komen o.a. punten als, een karakterisering van het gebruikte organisme en het mechanisme dat leidt tot een meetbaar effect, naar voren.

#### **ATP-TOX SYSTEM** [Willemsen et al. (1995)]

Het principe van deze test berust op het meten van de adenosine trifosfaat (ATP) concentratie. Dit is een maat voor fysiologische activiteit. Deze test kan uitgevoerd worden met bacteriën, algen en een aantal gisten. Willemsen (1995) geeft een beschrijving van een test met een bacterie. In agar gekweekte *Escherichia coli* worden gedurende een nacht in een nutriëntenmedium geplaatst. Na een 5 uur durende blootstelling aan het te testen monster wordt een ATP-bevrijdend middel toegevoegd, tezamen met luciferin en luciferase. Bij aanwezigheid van ATP als energiebron, wordt luciferase gereduceerd tot luciferine waardoor vervolgens licht wordt uitgestraald. Resultaten worden vaak weergegeven als een percentage van de luminescentieremming in onverdunde monsters, maar het is ook mogelijk om met behulp van een geschikte statistische methode de effectconcentratie te schatten die 50% remming geeft (EC50).

#### **BACTERIE EXO-ENZYM ASSAY** [Willemsen et al. (1995)]

Bij deze test wordt fluorescentie gebruikt als maat voor de activiteit van exo-enzymen van een mengsel van bacteriepopulaties. De activiteit van de exo-enzymen fosfatase en protease wordt door middel van een fluorescerend substraat gemeten in culturen van lokale veldpopulaties.

#### **ECHA BIOMONITOR** [ECHA INFO, ECHA Bioc.Mon., Willemsen et al. (1995)]

De ECHA biomonitor is een eenvoudige en goedkope bioassay. De ECHA biomonitor strip is geïmpregneerd met de bacterie *Bacillus sp.*, en een kleurstof voor de indicatie van groei (tetrazolium). Door bacteriegroei kleurt de strip rood. Groeiremming ontstaat waarschijnlijk door dehydrogenase-inhibitie. De strip wordt in het te testen monster gedipt en voorzichtig afgeschud. Het stripje wordt vervolgens 24 uur in een incubator bij 35 C-37 C bewaard en wordt daarna beoordeeld op de mate van verkleuring. Bij verkleuring wordt het monster niet toxisch bevonden. De kleur van de strip wordt vergeleken met een kleurenkaart en ingedeeld als niet-toxisch tot heel erg toxisch.

#### **LASER-MICROBE ASSAY** [Falkner et al. (1989), Willemsen et al. (1995)]

Dit systeem is gebaseerd op het meten van veranderingen in lichtverstrooiing door de zoetwater bacterie *Bacillus subtilis* veroorzaakt door toxicanten in het te testen monster. Een bacteriesuspensie wordt belicht in een laserfotometer. Het verstrooide licht wordt gemeten door een cirkel van 15 detectors. Lichtintensiteit wordt uitgezet tegen de verstrooiingshoek, met als resultaat een regelmatige golvende curve. De intensiteit van verstrooid licht is een directe functie van het aantal deeltjes, en dus het aantal bacteriën in suspensie. De grootte van de bacteriën, en de grootte distributie van de populatie kan afgeleid worden van de verplaatsing van de curve tussen kleine en grotere verstrooiingshoeken.

Metingen duren 0 tot 66 minuten. De resultaten worden op een on-line computer verwerkt, en worden uitgedrukt als de relatieve toename in populatie verdubbelingstijd. De test duurt 1 uur,

## Bijlage 1

waarbij 10 testconcentraties tegelijk verwerkt kunnen worden. Er kan gebruik worden gemaakt van gemanipuleerde bacteriën die specifiek gevoelig gemaakt kunnen worden. Ook kunnen bacteriepopulaties uit het veld worden gebruikt.

**LUMISTOX (NVN 6516)** [Dr. Lange Lumistox, Guzzella and Galassi (1993), Maas et al. (1993), NVN 6516 (1993), Willemsen et al. (1995), Zieseniss and Grabert (1994)]

De acute test met de bacterie *Photobacterium phosphoreum* wordt uitgevoerd volgens NVN 6516 (1993). Met een lichtmeter (Lumistox) wordt de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan verschillende concentraties van het te testen monster. De test- en incubatietemperatuur bedraagt 15 C. De analyses worden in duplo uitgevoerd, waarna per blootstellingsduur één gemiddelde EC20-waarde wordt bepaald. De EC20-waarde (Effect Concentratie) is gedefinieerd als de concentratie monster, waarbij na een gegeven blootstellingsduur een afname van 20% van de bioluminescentie ten opzichte van de blanco (= verdunningsmedium) kan worden waargenomen. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC20-waarden, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster aan te geven.

**METPAD** [Bitton et al. (1991), Bitton et al. (1992), Willemsen et al. (1995)]

MetPAD is een bioassay voor de specifieke detectie van de toxiciteit van zware metalen. Hierbij wordt gebruik gemaakt van gemanipuleerde en gevriesdroogde *Escherichia coli* bacteriën. Het toxiciteitseindpunt is de remming van de  $\beta$ -galactosidase activiteit. Dit enzym wordt specifiek geremd door metaalionen, maar is relatief ongevoelig voor veel organische verbindingen. De testduur bedraagt 90 minuten. De test wordt uitgevoerd door een mengsel van het te testen monster en bacteriën op een 'assay-pad' aan te brengen. Deze 'assay-pad' bevat een kleurloos chromogeensubstraat wat door het enzym  $\beta$ -galactosidase kan worden omgezet in een paarse kleur. Deze paarskleuring wordt kwalitatief of semi-kwantitatief vergeleken met een controle (= maximale kleuring). Door een aantal concentraties van het monster te testen kan een minimale effectconcentratie (MIC = minimal inhibitory concentration) bepaald worden.

**METPLATE** [Bitton et al. (1994), Willemsen et al. (1995)]

In tegenstelling tot MetPAD (13.1) is dit een kwantitatieve test waarbij gebruik wordt gemaakt van een 96-cup microplate. Het eindpunt is eveneens de remming van de  $\beta$ -galactosidase activiteit van de bacterie *Escherichia coli*. De testduur bedraagt 60 minuten. Het te testen monster wordt gemengd met de bacteriën en daarna in de microwell plate gepipetteerd. Vervolgens wordt hieraan een geelkleurig chromogeensubstraat toegevoegd. Door het enzym  $\beta$ -galactosidase kan dit gele substraat worden omgezet in een paarse kleur. Deze paarskleuring wordt m.b.v. een microplate reader (Multiscan) gekwantificeerd (hoe paarser, hoe minder toxisch). Uit deze resultaten wordt m.b.v. een geschikte statistische methode de effectconcentratie geschat die 50% remming van de  $\beta$ -galactosidase-activiteit geeft binnen 1 uur blootstelling (EC50).

**MICROTOX** [LBRAP (1995), Maas et al. (1993), Mulder (1993), Persoone et al. (1993), NVN 6516 (1993), Willemsen et al. (1995)]

Deze acute test met de bacterie *Photobacterium phosphoreum* wordt uitgevoerd volgens NVN 6516 (1993). De werking van deze test berust op de luminescentie van de bacterie als gevolg van respiratie (een deel van de uit de stofwisseling vrijkomende energie wordt als licht afgegeven). De

remming hiervan wijst op een toxisch effect. Met een lichtmeter (Microtox) wordt de afname van de bioluminescentie bij de bacterie beoordeeld na 5, 15 en 30 minuten blootstelling aan verschillende concentraties van het te testen monster. De test- en incubatietemperatuur bedraagt 15 C. De analyses worden in duplo uitgevoerd, waarna per blootstellingsduur één gemiddelde EC20-waarde wordt bepaald. De EC20-waarde (Effect Concentratie) is gedefinieerd als de concentratie testmedium, waarbij na een gegeven blootstellingsduur een afname van 20% van de bioluminescentie ten opzichte van de blanco (= verdunningsmedium) kan worden waargenomen. De laagste van de op de 3 tijdstippen bepaalde EC20-waarden, wordt gebruikt om de toxiciteit van het monster aan te geven.

#### **MICROTOX SOLID-PHASE TEST [Willemsen et al. (1995)]**

Met deze test kunnen gehele sedimenten getoetst worden. Het te testen sedimentmonster wordt gemengd met een bacteriesuspensie (*Photobacterium phosphoreum*). Na 15 minuten blootstelling wordt het geheel gecentrifugeerd. Het supernatant met de bacteriën wordt gepipetteerd in een cuvet, en de lichtemissie wordt gemeten met behulp van een Microtox-lichtmeter (zie verder bij 15.1, Microtox).

#### **POLYTOX [de Lange (1994)]**

De Polytox-kit bestaat uit een mengsel van gevriesdroogde bacterieculturen (Polytox-cultuur), die gebruikt worden in respirometrische tests. De test simuleert het effect van de remming van de respiratie van bacteriën door toxicanten. Het te testen monster wordt in een BOD-fles gemengd met voorbelucht, gedeïoniseerd en gedestilleerd water, waarna de Polytox -cultuur hierbij wordt gevoegd. Na hydratatie wordt de fles op een magnetische mixer geplaatst en na 19 en 21 minuten wordt het zuurstof gehalte gemeten. Uit deze gegevens wordt de remming van de respiratie bepaald door de gegevens te vergelijken met een blanco. Uit deze resultaten wordt m.b.v. een geschikte statistische methode de effectconcentratie geschat die 50% remming van de respiratie geeft binnen 19 en 21 minuten blootstelling (EC50).

#### **SEDIMENT CHROMOTEST/TOXI-CHROMOPAD [Willemsen et al. (1995)]**

Voor deze kwalitatieve test wordt gebruik gemaakt van gemanipuleerde en gevriesdroogde *Escherichia coli* bacteriën. Het toxiciteitseindpunt is de remming van de  $\beta$ -galactosidase activiteit. Dit enzym wordt specifiek geremd door metaalionen, maar is relatief ongevoelig voor veel organische verbindingen. De testduur bedraagt 120 minuten. De test wordt uitgevoerd door een mengsel van het te testen monster en bacteriën op een 'assay-pad' aan te brengen. Deze 'assay-pad' bevat een kleurloos chromogeensubstraat wat door het enzym  $\beta$ -galactosidase kan worden omgezet in een blauwe kleur. Deze blauwverkleuring wordt kwalitatief of semi-kwantitatief vergeleken met een controle (= maximale kleuring). Door een aantal concentraties van het monster te testen kan een minimale effectconcentratie (MIC = minimal inhibitory concentration) bepaald worden.

#### **STREPTOCEPHALUS IQ [Willemsen et al. (1995)]**

Deze IQ-test bepaalt de afname van een specifiek enzymactiviteit, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een speciaal fluorogeen substraat niet opnemen en/of metaboliseren. Voor deze test met *Streptocephalus*



## Bijlage 1

lus probiscideus worden de organismen blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling aan het monster, wordt een fluorogeen substraat aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt m.b.v. een geschikte statistische methode de effectconcentratie geschat die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50).

### **TOXI-CHROMOCHECK** [EBPI Info, Willemsen et al. (1995)]

Voor deze kwalitatieve bioassay wordt gebruik gemaakt van een gespecialiseerde mutant van de bacterie *Escherichia coli*. Het toxiciteitseindpunt is de remming van de  $\beta$ -galactosidase activiteit. Dit enzym wordt specifiek geremd door metaalionen, maar is relatief ongevoelig voor veel organische verbindingen. De testduur bedraagt 24 uur. De test wordt uitgevoerd door een mengsel van het te testen monster en bacteriën in een testvatje te incuberen met een kleurloos chromogeensubstraat wat door het enzym  $\beta$ -galactosidase kan worden omgezet in een blauwe kleur. Deze blauwverkleuring wordt kwalitatief of semi-kwantitatief vergeleken met een controle (= maximale kleuring). Door een aantal concentraties van het monster te testen kan een minimale effectconcentratie (MIC = minimal inhibitory concentration) bepaald worden.

### **TOXI-CHROMO TEST** [Kwan (1993), Willemsen et al. (1995)]

Dit is een kwantitatieve test waarbij gebruik wordt gemaakt van een microwell plate. Het eindpunt is de remming van de  $\beta$ -galactosidase activiteit van de bacterie *Escherichia coli*. De testduur bedraagt 90 minuten. Het te testen monster wordt gemengd met de bacteriën en daarna in de microwell plate gepipetteerd. Vervolgens wordt hieraan een kleurloos chromogeensubstraat toegevoegd. Door het enzym  $\beta$ -galactosidase kan dit substraat worden omgezet in een blauwe kleur. Deze blauwverkleuring kan m.b.v. een microplate reader of spectrofotometer worden gekwantificeerd (hoe blauwer, hoe minder toxisch). Uit deze resultaten wordt m.b.v. een geschikte statistische methode de effectconcentratie geschat die 50% remming van de  $\beta$ -galactosidase-activiteit geeft binnen 1,5 uur blootstelling (EC50).

Deze test kan ook als kwantitatieve test worden gebruikt waarbij de mate van blauwverkleuring visueel wordt vergeleken met de mate van blauwverkleuring in de controle.

### **VIBRIO HARVEYI DIRECT** [Willemsen et al. (1995)]

In deze test wordt gebruik gemaakt van een luminescerende mariene bacterie die kan overleven onder zuurstofarme omstandigheden. Onder aerobe omstandigheden wordt door respiratie licht geëmitteerd. De organismen worden op agar gekweekt. Voor het uitvoeren van de test moet een waterige aerobe cultuur worden bereid. De cultuur wordt gedurende 1 uur geïncubeerd met het te testen monster. Het nutriëntenmedium is voldoende voor katabolisme maar niet voor groei. Vervolgens wordt de luminescentie gemeten.

### **VIBRIO HARVEYI GROWTH** [Willemsen et al. (1995)]

De uitvoering van deze test is vergelijkbaar met *Vibrio harveyi* direct behalve dat er gebruik wordt gemaakt van een anaërobe cultuur. Deze wordt gemengd met een aerobe oplossing van het te

testen monster en na 5 uur blootstelling wordt de luminescentie gemeten. Voor deze assay wordt gebruik gemaakt van een rijk medium, zodat (remming van de) populatiegroei kan worden waargenomen.

## 2. Doelverbindingen

Afhankelijk van het type testorganisme (klasse, orde, familie, soort) dat gehanteerd wordt en het effect dat gemeten wordt, kunnen vele verschillende typen verbindingen een toxisch effect teweeg brengen. Veelal is het volledige scala aan verbindingen, dat tot een toxisch effect kan leiden bij een specifiek organisme, niet bekend. Derhalve is het veelal alleen mogelijk om een uitspraak te doen over die verbindingen waarvoor de toxische werking, bij een specifiek organisme, proefondervindelijk is vastgesteld. Voor de bioassays op basis van bacteriën als testorganisme (die hier worden besproken) is met name de gevoeligheid voor een aantal zware metaalionen, alsmede de gevoeligheid voor een aantal organochloor - en organofosfor bestrijdingsmiddelen, uitgetest. Het totale pakket van verbindingen waarvoor de tests kunnen worden toegepast zal echter aanmerkelijk breder zijn. Hieronder wordt uitsluitend ingegaan op de prestaties van de tests die uit experimentele resultaten konden worden afgeleid.

## 3. Gevoeligheid en performance

Voor de verbindingen, waarvoor de gevoeligheid van de bioassays op basis van bacteriën experimenteel werd vastgesteld, werden de volgende resultaten verkregen (tabel 1.3).

Tabel 1.3 Gevoeligheid en performance

Verbindingen	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )							
	ATP-tox system	ECHA Biocide Monitor	Laser / Microbe Bioassay System	Lumistox 30 min	MetPAD	Met-PLATE	Microtox 15 min	Microtox 30 min
Cadmium ( $\text{Cd}^{++}$ )	1,4e+03	-	5,2e-05	7,5e+03	3,0e+02	2,9e+01	1,7e+04	5,4e+03
Chroom ( $\text{Cr}^{++}$ )	-	-	-	-	-	-	-	-
Chroom ( $\text{Cr}^{+++}$ )	-	-	-	-	-	6,9e+03	1,5e+04	1,6e+04
Chroom ( $\text{Cr}^{++++}$ )	-	-	-	2,3e+03	-	-	-	-
Chroom ( $\text{Cr}^{+++++}$ )	-	-	-	-	-	-	-	1,5e+04
Koper ( $\text{Cu}^{++}$ )	1,2e+04	-	1,3e-01	1,8e+04	5,0e+02	2,2e+02	2,7e+02	1,6e+02
Kwik ( $\text{Hg}^{++}$ )	1,4e+02	6,3e+03	-	5,3e+02	5,0e+02	3,8e+01	4,9e+01	2,9e+01
Lood ( $\text{Pb}^{++}$ )	-	-	-	5,0e+04	5,0e+03	1,0e+04	4,6e+02	3,1e+02
Nikkel ( $\text{Ni}^{++}$ )	-	-	-	-	-	9,7e+02	2,5e+05	2,0e+04
Zink ( $\text{Zn}^{++}$ )	2,3e+03	-	3,0e-04	5,0e+04	5,0e+02	1,1e+02	3,2e+03	6,8e+02
alfa-Endosulfan	-	-	-	-	-	-	-	-
gamma-HCH (lindaan)	-	-	-	1,1e+04	5,0e+05	-	1,1e+04	5,7e+03
Pentachloorfenol (PCP)	-	-	-	-	-	5,0e+05	6,1e+02	5,2e+02
Azinfos-methyl	-	-	-	-	-	-	-	-
Cumafos	-	-	-	-	-	-	-	-
Diazinon	-	-	-	1,7e+03	-	-	-	-
Malathion	-	-	1,6e+00	-	-	-	-	3,0e+03
Parathion	-	-	-	-	-	-	2,8e+04	-
Fluorantheen	-	-	-	-	-	-	2,0e+03	-

## Bijlage 1

Tabel 1.3, vervolg

Verbinding	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )							
	Microtox 5 min	Sedi- ment- Chromo- test/Toxi- ChromoPad	Strepto- cephalus IQ	Toxi- Chromo- Check	Toxi- Chromo- test (pH 5.5)	Toxi- Chromo- test (pH 7.5)	Vibrio harveyi direct	Vibrio harveyi growth
Cadmium (Cd++)	9,8e+04	2,0e+01	5,1e+02	8,0e+03	1,5e+04	-	2,1e+02	4,9e+03
Chroom (Cr++)	6,5e+05	-	-	-	-	-	-	-
Chroom (Cr+++)	1,1e+04	-	-	-	-	-	-	-
Chroom (Cr++++)	-	-	-	-	-	-	-	-
Chroom (Cr++++++)	-	-	-	-	-	-	-	-
Koper (Cu++)	1,3e+03	9,0e+01	1,6e+02	1,5e+04	-	-	1,6e+02	6,0e+03
Kwik (Hg++)	4,7e+01	8,5e-02	1,6e+01	5,0e+02	6,0e+01	8,9e+01	2,0e+00	1,2e+02
Lood (Pb++)	1,7e+03	1,8e+02	-	-	-	-	7,4e+01	6,5e+03
Nikkel (Ni++)	1,1e+06	1,8e+02	-	1,5e+04	-	-	-	-
Zink (Zn++)	5,6e+04	2,0e+01	1,6e+03	3,0e+04	2,5e+04	-	1,1e+02	3,5e+03
alfa-Endosulfan	> 250	-	-	-	-	1,2e+04	-	-
gamma-HCH (lindaan)	3,2e+05	-	6,2e+02	-	3,0e+03	8,0e+04	-	-
Pentachloorfenol (PCP)	9,2e+02	-	-	1,5e+04	-	-	-	-
Azinfos-methyl	-	-	-	-	-	1,0e+04	-	-
Cumafos	-	-	-	-	-	2,5e+04	-	-
Diazinon	1,7e+03	-	-	-	1,5e+04	4,0e+05	-	-
Malathion	3,0e+03	-	-	-	3,0e+04	6,0e+04	-	-
Parathion	8,5e+03	-	-	-	-	-	-	-
Fluorantheen	-	-	-	-	-	-	-	-

#### 4. Commerciële toegankelijkheid

Tabel 1.4 geeft een overzicht van de commerciële toegankelijkheid van de verschillende tests.

Tabel 1.4 Commerciële toegankelijkheid

Bioassay	Commerciële toegankelijk via
ATP-tox system	niet
Bacterie exo-enzym assay	niet
Echa biomonitor	Echa microbiology ltd.
Laser-microbe assay	niet
Lumistox (nvn 6516)	dr. Lange benelux.
Metpad	groep 206 technologies inc. <sup>a</sup>
Metplate	groep 206 technologies inc. <sup>a</sup>
Microtox	Petromation b.v.
Microtox solid-phase test	Petromation b.v.
Polytox	ja
Toxi-chromopad	AquaSense b.v.
Streptosephalus IQ	in ontwikkeling
Toxi-chromocheck	AquaSense b.v.
Toxi-chromo test	AquaSense b.v.
Vibrio harveyi direct	niet
Vibrio harveyi growth	niet

<sup>a</sup>: (University of Florida)

## Bijlage 1

### BIOASSAY OP BASIS VAN EENCCELLIGEN: SPIROSTOMUM AMBIGUUM (PROTOXKIT F)

#### 1. Principe

Dit is een acute toxiciteitstest waarbij gebruik wordt gemaakt van de eencellige *Spirostomum ambiguum*. De testduur bedraagt (1, 4) 24 (of 48) uur. Eindpunten zijn cel-deformaties en sterfte. Op basis van de resultaten kan m.b.v. een geschikte statistische methode de concentratie worden geschat die resulteert in 50% deformaties (EC50) of 50% mortaliteit (LC50). Toepassingsgebied, gevoeligheid, performance, e.d. zijn ten dele bekend [Nalecz-Jawecki et al. (1993)]

#### 2. Verbindingen

Afhankelijk van het type testorganisme (klasse, orde, familie, soort) dat gehanteerd wordt en het effect dat gemeten wordt, kunnen vele verschillende typen verbindingen een toxisch effect teweeg brengen. Veelal is het volledige scala aan verbindingen, dat tot een toxisch effect kan leiden bij een specifiek organisme, niet bekend. Derhalve is het veelal alleen mogelijk om een uitspraak te doen over die verbindingen waarvoor de toxische werking, bij een specifiek organisme, proefondervindelijk is vastgesteld. Voor de onderhavige bioassay (*Spirostomum ambiguum* (protoxkit F)) is met name de gevoeligheid voor een beperkt aantal zware metaalionen uitgetest. Het totale pakket van verbindingen waarvoor de test kan worden toegepast zal echter aanmerkelijk breder zijn. Hieronder wordt uitsluitend ingegaan op de prestaties van de test die uit experimentele resultaten konden worden afgeleid.

#### 3. Performance

Voor de verbindingen, waarvoor de gevoeligheid van de *Spirostomum ambiguum* (Protoxkit F) test experimenteel werd vastgesteld, werden de volgende resultaten verkregen (tabel 1.5).

Tabel 1.5 Gevoeligheid van *spirostomum ambiguum*

Verbinding	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )
Cadmium (Cd++)	5,3e+03
Koper (Cu++)	4,4e+00
Kwik (Hg++)	2,4e+01

#### 4. Toegankelijkheid

Deze test wordt op dit moment als PROTOXKIT F ontwikkeld door de Universiteit van Gent en zal daarna commercieel beschikbaar zijn via AquaSense b.v.

## BIOASSAYS OP BASIS VAN KREEFTACHTIGEN

### 1. Principe

Hieronder wordt voor elk van de kreeftachtigen-assays uit tabel 1.1 een korte beschrijving gegeven. Daarbij komen o.a. punten als, een karakterisering van het gebruikte organisme en het mechanisme dat leidt tot een meetbaar effect, naar voren.

**ARTOTOXKIT M** [Calleja et al. (submitted), Creasel (1990), LBRAP (1995), Persoone et al. (1993), Willemsen et al. (1995)]

Deze acute test wordt uitgevoerd volgens het bij de testkit bijgeleverde protocol (Creasel, 1990). De sterfte van juvenielen van de kreeftachtige *Artemia salina* wordt beoordeeld na 24 uur blootstelling aan het te testen monster. Voor de test moet een verdunningsreeks van het monster worden aangemaakt met het in de TOXKIT bijgeleverde standaard zoutwatermedium. Als blanco wordt 100% zoutwatermedium getest. Tijdens de test worden de proefdieren niet gevoerd. Na 24 uur wordt het aantal dode dieren per testconcentratie gescoord. Uit deze testresultaten wordt met behulp van een geschikte statistische methode de (effect)concentratie geschat die 50% sterfte geeft binnen 24 uur blootstelling (LC50).

**THAMNOTOXKIT F** [Centano et al. (in press), Creasel (1992), LBRAP (1995), Persoone et al. (1993), Willemsen et al. (1995)]

Volgens het standaardprotocol behorende bij deze testkit (Creasel, 1992) wordt de sterfte bij juvenielen van de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus* beoordeeld na 24 uur blootstelling aan verschillende concentraties van het te testen monster. De verdunningen worden aangemaakt met het in de TOXKIT bijgeleverde standaard zoetwatermedium. Als blanco wordt 100% zoetwatermedium getest. Tijdens de test worden de proefdieren niet gevoerd. Uit deze testresultaten wordt met behulp van een geschikte statistische methode de (effect)concentratie geschat die 50% sterfte geeft binnen 24 uur blootstelling (LC50).

**THAMNOTOXKIT FLUO** [Centano et al. (in press), Creasel (1992), LBRAP (1995), Persoone et al. (1993), Willemsen et al. (1995)]

Net als bij de IQ-testen wordt in deze test de afname van een specifiek enzymactiviteit bepaald, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een speciaal fluorogeen-substraat niet opnemen en/of metaboliseren. Voor de Thamnotoxkit Fluo wordt gebruik gemaakt van de Thamnotoxkit F. De procedure voor het inzetten van de test is exact hetzelfde. De organismen worden blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling wordt het fluorogeen-substraat (MUF) aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50).

## Bijlage 1

### **IQ-TEST ARTEMIA SALINA** [Willemsen et al. (1995)]

De IQ-test bepaalt de afname van een specifiek enzymactiviteit, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een speciaal fluorogeen-substraat niet opnemen en/of metaboliseren. De acute test met het pekelkreeftje *Artemia salina* wordt uitgevoerd volgens het standaardprotocol behorende bij deze test. Hierbij worden de organismen blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling wordt het fluorogeen substraat (IQ-ADDITIVE\*) aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50.).

### **IQ-TEST CERIODAPHNIA DUBIA** [AquaSurvey (1993), Willemsen et al. (1995)]

De IQ-test bepaalt de afname van een specifiek enzymactiviteit, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een speciaal fluorogeen substraat niet opnemen en/of metaboliseren. De acute test met de kreeftachtige *Ceriodaphnia dubia* wordt uitgevoerd volgens het standaardprotocol behorende bij deze test (AquaSurvey, 1993). Hierbij worden de organismen blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling wordt het fluorogeen substraat (IQ-ADDITIVE\*) aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50.).

### **IQ-TEST DAPHNIA MAGNA** [AquaSurvey (1994), Janssen and Persoone, Willemsen et al. (1995)]

De IQ-test bepaalt de afname van een specifiek enzymactiviteit, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een speciaal fluorogeen substraat niet opnemen en/of metaboliseren. De acute test met de watervlo *Daphnia magna* (of *Daphnia pulex*) wordt uitgevoerd volgens het standaardprotocol behorende bij deze test (AquaSurvey, 1994). Hierbij worden de organismen blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling wordt het fluorogeen substraat (IQ-ADDITIVE\*) aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50.).

### **IQ-TEST MYSIDOPSIS BAHIA** [Willemsen et al. (1995)]

De IQ-test bepaalt de afname van een specifiek enzymactiviteit, veroorzaakt door toxicanten. In tegenstelling tot gezonde organismen, kunnen de door toxische stoffen aangetaste organismen een

speciaal fluorogeen substraat niet opnemen en/of metaboliseren. De acute test met de mysid *Mysidopsis bahia* wordt uitgevoerd volgens het standaardprotocol behorende bij deze test. Hierbij worden de organismen blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster. De organismen worden gedurende de test niet gevoerd. Na 1 uur blootstelling wordt het fluorogeen substraat (IQ-ADDITIVE\*) aan het testmedium toegevoegd. Het enzymstelsel splitst de fluorescerende marker van het substraat. Na belichting met ultraviolet licht ("black light") is dit zichtbaar in de vorm van helder fluorescerende organismen. Na 15 minuten wordt het aantal fluorescerende organismen geteld. Op basis van deze resultaten wordt de effectconcentratie bepaald die 50% remming van de fluorescentie geeft binnen 1,25 uur blootstelling (EC50).

**ISO 6341 (ACUTE WATERVLOOIENTEST)** [Calleja et al. (submitted), ISO 6341 (1989), Janssen and Persoone, LBRAP (1995), Maas et al. (1993), Mulder (1993), Persoone et al. (1993), Toussaint et al. (1994)]

Deze acute toxiciteitstest wordt volgens ISO 6341 (1989) uitgevoerd met de algemeen in het Nederlandse oppervlaktewater voorkomende watervlo *Daphnia magna*. De testorganismen worden blootgesteld aan verschillende concentraties van het te testen monster (bijvoorbeeld een chemische stof, oppervlakte-, afval- of poriewater etc.). Deze testconcentraties worden aangemaakt door verdunning van het monster met een gestandaardiseerd zoetwatermedium. Dit niet gecontamineerde zoetwatermedium dient tevens als blanco. Tijdens de test worden de proefdieren niet gevoerd. De testtemperatuur bedraagt 20 + 1 C. Na 24 uur blootstelling (= testduur) wordt per testconcentratie het aantal dode en immobiele dieren gescoord (*immobiel = niet meer zwemmend, maar wel nog bewegende antennes*). Uit deze testresultaten wordt met behulp van een geschikte statistische methode de (effect)concentratie geschat die 50% immobilisatie (= immobiel + dood) geeft binnen 24 uur blootstelling (EC50).

## 2. Verbindingen

Afhankelijk van het type testorganisme (klasse, orde, familie, soort) dat gehanteerd wordt en het effect dat gemeten wordt, kunnen vele verschillende typen verbindingen een toxisch effect teweeg brengen. Veelal is het volledige scala aan verbindingen, die tot een toxisch effect kunnen leiden bij een specifiek organisme, niet bekend. Derhalve, is het veelal alleen mogelijk om een uitspraak te doen over die verbindingen waarvoor de toxische werking, bij een specifiek organisme, proefondervindelijk is vastgesteld. Voor de bioassays op basis van kreeftachtigen als testorganisme (die hier worden besproken) is met name de gevoeligheid voor een aantal zware metaalionen, alsmede de gevoeligheid voor een aantal organochloor bestrijdingsmiddelen, uitgetest. Het totale pakket van verbindingen waarvoor de tests kunnen worden toegepast zal echter aanmerkelijk breder zijn. Hieronder wordt uitsluitend ingegaan op de prestaties van de tests die uit experimentele resultaten konden worden afgeleid.

## 3. Performance

Voor de verbindingen, waarvoor de gevoeligheid van de bioassays op basis van kreeftachtigen experimenteel werd vastgesteld, werden de volgende resultaten verkregen (tabel 1.6).



## Bijlage 1

Tabel 1.6 Gevoeligheid en performance

Verbinding	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )						
	Artokit M	IQ-test Artemia salina	IQ-test Ceriodaphnia dubia	IQ-test Daphnia magna	IQ-test Mysidopsis bahia	ISO 6341 (acute water-vlooiëntest)	Thamnotoxkit F
Cadmium ( $\text{Cd}^{++}$ )	2,0e+05	4,6e+04	2,6e+03	3,8e+02	2,4e+02	7,0e+02	2,0e+02
Chroom ( $\text{Cr}^{+++}$ )	-	-	-	-	-	1,3e+03	-
Chroom ( $\text{Cr}^{++++}$ )	-	4,2e+04	1,3e+03	8,3e+02	-	-	-
Chroom ( $\text{Cr}^{+++++}$ )	1,0e+04	-	-	7,2e+02	-	3,5e+02	1,8e+01
Koper ( $\text{Cu}^{++}$ )	7,2e+02	8,4e+03	2,6e+02	7,9e+01	6,3e+02	7,0e+01	7,9e+01
Kwik ( $\text{Hg}^{++}$ )	1,5e+04	1,5e+03	4,6e+01	2,0e+01	1,1e+02	8,1e+00	4,0e+01
Lood ( $\text{Pb}^{++}$ )	-	-	-	-	-	3,4e+02	1,6e+03
Nikkel ( $\text{Ni}^{++}$ )	-	-	-	-	-	8,6e+03	2,2e+03
Zink ( $\text{Zn}^{++}$ )	5,7e+05	4,2e+04	4,6e+02	2,7e+02	4,0e+03	1,2e+03	2,3e+02
alfa-Endosulfan	-	-	-	-	-	6,2e+02	-
gamma-HCH (lindaan)	6,4e+03	6,0e+03	-	1,7e+03	-	1,3e+03	-
Pentachloorfenol (PCP)	5,1e+02	-	-	-	-	3,9e+02	3,5e+01
Diazinon	-	-	-	6,6e+01	-	-	1,5e+04
Fenitrothion	-	-	-	-	-	-	4,0e+03
Malathion	3,8e+05	-	-	2,2e+01	-	1,0e+00	-
Parathion	-	-	-	3,2e+02	-	2,0e+00	-

### 4. Toegankelijkheid

Tabel 1.7 toont een overzicht van de commerciële toegankelijkheid van de tests.

Tabel 1.7 Commerciële toegankelijkheid

Bioassay	Commercieel toegankelijk via
Artokit M	AquaSense b.v.
Thamnotoxkit F	AquaSense b.v.
Thamnotoxkit fluo	AquaSense b.v.
IQ-test artemia salina	AquaSense b.v. <sup>a</sup>
IQ-test ceriodaphnia dubia	AquaSense b.v. <sup>a</sup>
IQ-test daphnia magna	AquaSense b.v. <sup>a</sup>
IQ-test mysidopsis bahia	AquaSense b.v. <sup>a</sup>
Iso 6341 (acute watervlooiëntest)	niet

<sup>a</sup>: De kit bevat géén organismen. Deze moeten apart worden bijbesteld of zelf worden gekweekt.

## BIOASSAYS OP BASIS VAN RADERDIERTJES

### 1. Principe

Hieronder wordt voor elk van de raderdiertjes-assays uit tabel 1.1 een korte beschrijving gegeven. Daarbij komen o.a. punten als, een karakterisering van het gebruikte organisme en het mechanisme dat leidt tot een meetbaar effect, naar voren.

#### **BRACHIONUS FILTRATION TEST** [Willemsen et al. (1995)]

Deze methode berust op het meten van de filtratie-activiteit van *Brachionus plicatilis*, met behulp van een fluorescerend substraat. De blootstellingsduur (testduur) is 35 minuten. De gevonden effectconcentraties zijn te vergelijken met die van de 48h reproductie toxiciteitstest, waardoor de test misschien chronische toxiciteit zou kunnen voorspellen.

#### **ROTOXKIT F** [Calleja et al. (submitted), Creasel (1990), LBRAP (1995), Persoone et al. (1993), Willemsen et al. (1995)]

Deze acute test wordt uitgevoerd volgens het bij deze testkit bijgeleverde protocol (Creasel, 1990). De sterfte van juvenielen van het raderdiertje *Brachionus calyciflorus* wordt beoordeeld na 24 uur blootstelling aan het te testen monster. Voor de test moet een verdunningsreeks van het monster worden aangemaakt met het in de TOXKIT bijgeleverde standaard zoetwatermedium. Als blanco wordt 100% zoetwatermedium getest. Tijdens de test worden de proefdieren niet gevoerd. Na 24 uur wordt het aantal dode dieren per testconcentratie gescoord. Uit deze testresultaten wordt met behulp van een geschikte statistische methode de (effect)concentratie geschat die 50% sterfte geeft binnen 24 uur blootstelling (LC50).

#### **ROTOXKIT M** [Creasel (1990), LBRAP (1995), Persoone et al. (1993), Willemsen et al. (1995)]

Volgens het standaardprotocol behorende bij deze testkit (Creasel, 1990) wordt bij deze test de sterfte bij juvenielen van het raderdiertje *Brachionus plicatilis* beoordeeld na 24 uur blootstelling aan verschillende concentraties van het te testen monster. In tegenstelling tot ROTOXKIT F is dit een test voor brak- en zoutwatermonsters. De verdunningen worden aangemaakt met het in de TOXKIT bijgeleverde standaard zoutwatermedium. Als blanco wordt 100% zoutwatermedium getest. Tijdens de test worden de proefdieren niet gevoerd. Uit deze testresultaten wordt met behulp van een geschikte statistische methode de (effect)concentratie geschat die 50% sterfte geeft binnen 24 uur blootstelling (LC50).

### 2. Verbindingen

Afhankelijk van het type testorganisme (klasse, orde, familie, soort) dat gehanteerd wordt en het effect dat gemeten wordt, kunnen vele verschillende typen verbindingen een toxisch effect teweeg brengen. Veelal is het volledige scala aan verbindingen, die tot een toxisch effect kunnen leiden bij een specifiek organisme, niet bekend. Derhalve, is het veelal alleen mogelijk om een uitspraak te doen over die verbindingen waarvoor de toxische werking, bij een specifiek organisme, proefondervindelijk is vastgesteld. Voor de bioassays op basis van raderdiertjes als testorganisme (die hier worden besproken) is met name de gevoeligheid voor een aantal zware metaalionen, alsmede de gevoeligheid voor een aantal organochloor - en organofosfor bestrijdingsmiddelen, uitgetest. Het totale pakket van verbindingen waarvoor de tests kunnen worden toegepast zal echter aanmerkelijk

## Bijlage 1

breder zijn. Hieronder wordt uitsluitend ingegaan op de prestaties van de tests die uit experimentele resultaten konden worden afgeleid.

### 3. Performance

Voor de verbindingen, waarvoor de gevoeligheid van de bioassays op basis van kreeftachtigen experimenteel werd vastgesteld, werden de volgende resultaten verkregen (tabel 1.8).

Tabel 1.8 Gevoeligheid en performance

Verbinding	Gevoeligheid ( $\mu\text{g/l}$ )			
	Brachionus filtration test	Rotokit F	Rotokit M	Rotokit M brakwater
Cadmium ( $\text{Cd}^{++}$ )	2,5e+02	1,2e+03	3,9e+04	4,6e+04
Chroom ( $\text{Cr}^{++++++}$ )	-	8,3e+03	6,0e+04	-
Koper ( $\text{Cu}^{++}$ )	5,0e+01	2,6e+01	6,3e+01	8,7e+01
Kwik ( $\text{Hg}^{++}$ )	1,0e+02	5,3e+01	6,1e+01	6,1e+01
Lood ( $\text{Pb}^{++}$ )	-	6,3e+03	4,0e+04	4,0e+03
Nikkel ( $\text{Ni}^{++}$ )	-	4,0e+03	2,0e+04	-
Zink ( $\text{Zn}^{++}$ )	-	2,4e+03	4,8e+03	4,8e+03
alfa-Endosulfan	-	5,2e+03	5,6e+03	-
gamma-HCH (lindaan)	-	3,4e+03	3,6e+04	-
Pentachloorfenol (PCP)	-	4,0e+02	1,9e+03	-
Diazinon	2,0e+04	2,9e+04	4,9e+04	-
Fenitrothion	-	6,6e+03	8,9e+03	-
Malathion	-	3,4e+04	4,6e+04	6,0e+04
Parathion	-	2,9e+04	--	-
Trichloorfon	-	4,7e+04	2,7e+05	-

### 4. Commerciële toegankelijkheid

Tabel 1.9 geeft een overzicht van de commerciële toegankelijkheid.

Tabel 1.9 De commerciële toegankelijkheid

Bioassay	Commercieel toegankelijk via
Brachionus filtration test	niet
Rotokit F	AquaSense b.v.
Rotokit M	AquaSense b.v.

## IMMUNOASSAYS (als indicatieve methode voor de detectie van pesticiden in water)

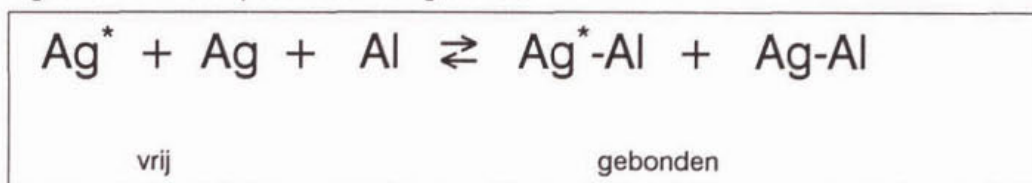
### 1. Principe

De immunoassay is gebaseerd op de bindingsreactie tussen een specifiek eiwit, het antilichaam (Al), en een doelverbinding, het antigeen (Ag). Deze reactie kan in een reageerbuis uitgevoerd worden en is schematisch weergegeven in figuur 2.1a. De reactie in figuur 2.1b is een variant, de competitieve immunoassay (IA), die het mogelijk maakt de concentratie van Ag te kwantificeren. Hierbij wordt gebruik gemaakt van een gemerkt Ag,  $Ag^*$ , zodanig dat Ag en  $Ag^*$  vergelijkbaar binden aan het antilichaam.

Figuur 2.1a Bindingsreactie tussen antigeen en antilichaam



Figuur 2.1b Competitieve bindingsreactie



Ag	: antigeen	vrij	:	de vrije fractie
$Ag^*$	: gemerkt Ag	gebonden	:	de gebonden fractie
Al	: antilichaam			

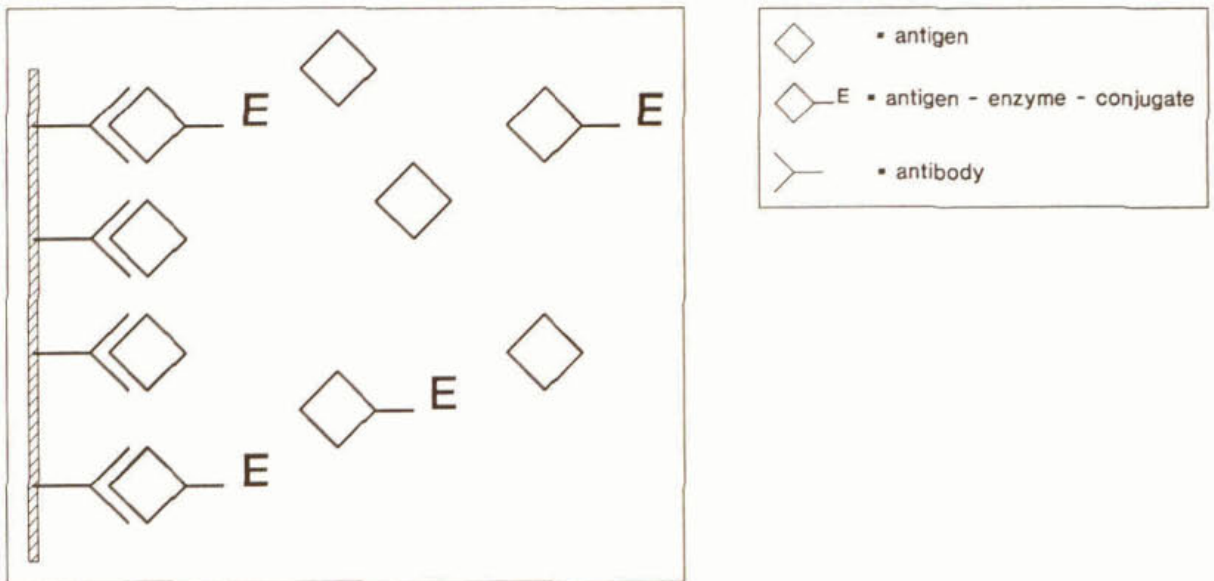
In de praktijk worden eerst de optimale omstandigheden voor de reactie tussen Al en Ag bepaald (hoeveelheden, pH, ionsterkte, enz.). Voor de kwantitatieve reactie wordt bijvoorbeeld in een reageerbuis een bepaalde hoeveelheid antilichamen (d.w.z. een beperkt aantal bindingsplaatsen) gedaan. Hieraan wordt samen met het te meten monster (met Ag) een bepaalde beperkte hoeveelheid gemerkt ( $Ag^*$ ) antigeen toegevoegd. Nadat de reactie is verlopen tot evenwicht, worden de vrije en gebonden fracties gescheiden en de hoeveelheid  $Ag^*$  in de gebonden fractie wordt gemeten. De gemeten hoeveelheid  $Ag^*$  in de gebonden fractie zal dan omgekeerd evenredig zijn aan de concentratie Ag in het monster.

Detectie van  $Ag^*$  c.q.  $Ag^*\text{-Al}$  kan op diverse manieren plaatsvinden. Het betreffende label kan een radioisotoop zijn (RIA), een fluorofoor (FIA), een (chemi)luminescerende stof (LIA) of een enzym (EIA), dat met behulp van een substraat een chromogeen omzet in spectrofotometrisch te meten kleurstof. Deze laatste labelvorm wordt momenteel het meest toegepast in immunoassays voor het aantonen van milieuverontreinigende stoffen.

## Bijlage 2

In de commercieel verkrijgbare immunoassays wordt gebruik gemaakt van weer een variant van de EIA, namelijk de ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay). Hierbij is het antilichaam gebonden aan een vaste drager, hetgeen de scheiding tussen gebonden en vrije fracties van het reactiemengsel vergemakkelijkt, omdat de vrije fractie slechts weggespoeld hoeft te worden. Het principe van de competitieve ELISA is weergegeven in figuur 2.2.

Figuur 2.2 Principe van de ELISA



Antigeen in het monster en gemerkt antigeen gaan een competitie aan voor bindingsplaatsen op het aan de vaste drager gekoppelde antilichaam (antibody). Na afscheiding van de vrije fractie, wordt de hoeveelheid gemerkt antigeen gedetecteerd d.m.v. een enzymreactie.

De belangrijkste component in de IA is het antilichaam. Een antilichaam wordt gemaakt door een proefdier te immuniseren met het betreffende antigeen en na een bepaalde tijd het dan gevormde antiserum te isoleren. Voor een goede immunrespons moet het antigeen immuuncompetent zijn, d.w.z. lichaamsvreemd, groter dan  $\pm 5000$  Dalton en chemisch complex. Antigenen met een laag molecuulgewicht, waartoe de pesticiden behoren, zijn van nature niet immuuncompetent en worden haptene genoemd. Voor het opwekken van antilichamen kan een dergelijk hapteen vergroot worden door het te koppelen aan een - lichaamsvreemd - eiwit, waardoor het alsnog immuuncompetent wordt.

Een antiserum opgewekt in een proefdier, een polykonaal antiserum/antilichaam, bevat niet één maar een verzameling antilichamen, die niet alleen binden aan het betreffende antigeen/hapteen, maar ook aan structureel verwante verbindingen. Dit verschijnsel wordt kruisreactiviteit genoemd. *Afhankelijk van de omstandigheden (type proefdier, immunisatietijd, antigeen/hapteen e.d.) kan een antiserum meer of minder specifiek zijn, d.w.z. meer of minder kruisreactiviteit voor verwante verbindingen vertonen. Dit kenmerk bepaalt de specificiteit/selectiviteit van een immunoassay.*

Een manier om de specificiteit te verhogen is het maken van antilichamen met behulp van de hybridoomtechniek. Cellen die antilichamen produceren worden gefuseerd met myeloomcellen tot hybridoomcellen, die permanent doorgekweekt kunnen worden. Door afzonderlijke cellen op te kweken worden zogenaamde klonen verkregen die elk een gedefinieerd antilichaam synthetiseren en afscheiden. Uit een groot aantal klonen kunnen dan die klonen geselecteerd worden, die een antilichaam met gewenste eigenschappen (kruisreactiviteit, affiniteit) produceren. Dergelijke antilichamen worden monoklonale antilichamen genoemd.

In de meeste commercieel verkrijgbare IA's worden polyklonale antilichamen toegepast. Afhankelijk van de kruisreactiviteit moeten deze IA's beschouwd worden als stofs specifiek of groeps specifiek. In toenemende mate vindt toepassing van monoklonale antilichamen plaats en hierdoor zal waarschijnlijk het aantal zeer stofs specifieke IA's groter worden. Een geheel nieuwe ontwikkeling op het gebied van de immunochemie is de in-vitro produktie van recombinante antilichamen, waarbij deze zodanig gemanipuleerd kunnen worden dat ze voldoen aan vooraf gedefinieerde eigenschappen en in feite op maat gemaakt kunnen worden. Vooralsnog zullen IA-kits met recombinante antilichamen echter nog niet commercieel verkrijgbaar zijn.

Alle commercieel verkrijgbare IA's voor milieuverontreinigende stoffen zijn competitieve ELISA's. Hierbij is het antilichaam gekoppeld aan een vaste drager. De vaste drager is een microtiterplaat, een buis of een magnetiseerbaar deeltje. De tracer is in deze geval een enzymgekoppeld antigeen. Monsters kunnen direct in een klein volume (100 - 500  $\mu$ l) gemeten worden. De uitvoering verloopt praktisch altijd volgens een standaard procedure. Monster en tracer ( $Ag^*$ ) worden aan de vaste drager toegevoegd. Na een bepaalde incubatietijd wordt de vrije fractie afgescheiden en de gebonden fase gewassen. Daarna worden substraat en chromogeen toegevoegd voor de enzymreactie. Na een bepaalde incubatietijd wordt de reactie gestopt en de ontwikkelde kleur wordt spectrofotometrisch gemeten. Aan de hand van een ijkcurve kan dan de concentratie van het antigeen in het monster berekend worden (zie voor het opstellen van een ijkcurve paragraaf 3 in deze bijlage).

Opgemerkt moet worden dat de hieronder beschreven kits uitgevoerd zijn voor meting in het lab (semi)kwantitatief alsook voor meting in het veld (kwalitatief). Het semi-kwantitatieve karakter wordt veroorzaakt enerzijds door mogelijke matrixeffecten ten gevolge van de directe meting in het monster, anderzijds door mogelijke kruisreagerende stoffen. Deze factoren kunnen leiden tot een vals-positieve uitslag. Vals-negatieve resultaten worden daarentegen in principe niet gevonden, hoewel het mogelijk is dat matrixfactoren de binding tussen Al en Ag storen.

## 2. Doelverbindingen

De meeste commercieel verkrijgbare IA-kits zijn ontworpen voor één bepaalde doelverbinding, maar kunnen ten gevolge van de specificiteit van het antilichaam ook gebruikt worden als beperkt groeps specifiek. Slechts enkele zijn groeps specifiek ontworpen. Van de door de waterbeheerders gemeten parameters is voor een aantal een immunoassaykit beschikbaar. Voor groeps specifieke assays betreft het daarbij assays voor: BTEX, Chloorfenoxycarbonsuren, Cyclodiënen, Fenylureum-verbindingen, PCB, PAK, RDX (explosieven), TNT, TPH en Triazine. Voor stofspecifieke assays betreft het daarbij assays voor: 2,4-D, Acetochlor, Alachlor, Aldicarb, Atrazine, Benomyl, BTEX,

## Bijlage 2

Captan, Carbaryl, Carbendazim, Carbofuran, Chloorthalonil, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-ethyl, Chlorsulfuron, Cyanazine, Diazinon, Imazapyr, Imazaquin, Isoproturon, Isoproturon, Metalaxyl, Metolachlor, Metsulfuron-methyl, Nicotine, Paraquat, Parathion-(methyl/ethyl), PCP RISC, Pentachloorfenol, Procymidon, TNT (in water), Triasulfuron en Trifluralin.

Over het algemeen worden metabolieten van toegepaste bestrijdingsmiddelen (nog) niet gemeten. Uitzonderingen zijn die van atrazine en aldicarb. Omdat het belangrijk kan zijn metabolieten te betrekken in een analyse van water op verontreiniging door een bepaald bestrijdingsmiddel, is het relevant voor de betreffende immunoassay het totale kruisreactiviteitsspectrum te vermelden. In Tabel 2.1 is dit spectrum van de diverse kits voor atrazine en aldicarb weergegeven. Uit deze tabel blijkt, dat de kits voor aldicarb in praktisch dezelfde mate gevoelig zijn voor de metaboliet aldicarbsulfon, terwijl aldicarbsulfoxyde niet kruisreageert. De kits voor atrazine vertonen alle kruisreactiviteit met propazine, terwijl de kit van Baker in feite een groepspecifieke assay is voor de triazines.

Tabel 2.1 Kruisreactiviteiten in Immunoassaykits voor aldicarb en atrazine

<b>Aldicarb</b>	Millip.plate <sup>a</sup>	Millip.tube <sup>b</sup>	Baker <sup>b</sup>	Agrid. <sup>a</sup>	Ensys
Aldicarb	100	100	100		
Aldicarbsulfon	83	100	93		
Aldicarbsulfoxyde	0,9	6,7	14		
Methomyl	-	-	2,5		
<b>Atrazine</b>	Millip.plate <sup>a</sup>	Millip.tube <sup>b</sup>	Baker <sup>b</sup>	Agrid. <sup>a</sup>	Ensys
Atrazine	100		100	100	100
hydroxy-atrazine	2,5		4,2	7	-
de-ethyl-atrazine	1,3		74	2	1,7
de-isopropyl-atrazine	0,1		5,8	<0,1	-
di-dealkyl-atrazine	<0,1		-	<0,1	-
ametryn	18		87	18	-
cyanazine	0,6		4,6	0,5	-
propazine	244		139	155	71
simazine	6,3		14	3	2,9
terbuthylazine	11		15	-	-
trietazine	22		-	-	-
prometryn	-		85	34	1,4
prometon	-		82	39	-
terbutryn	-		51	-	-
hydroxy-simazine	-		-	11	-
alachlor	-		-	<0,1	-
metolachlor	-		-	<0,1	-
trifluralin	-		-	<0,1	-
aldicarb	-		-	<0,1	-
scepter	-		-	<0,1	-

De kruisreactiviteiten van de verschillende stoffen zijn weergegeven in percentage ten opzichte van aldicarb respectievelijk atrazine zoals vermeld in de verschillende kitbijsluiters; Millip. plate<sup>a</sup> = Millipore platekit, berekend op 50 % B; Milli.tube<sup>b</sup> = Millipore tubekit, berekend op 90 % B; Baker<sup>b</sup> = Baker kits, berekend op 90 % B; Agrid.<sup>a</sup> = Agridiagnostica kits, berekend op 90 % B; Ensys = Ensys kits, zonder opgave van de berekeningswijze.

### 3. Performance

Een immunoassay wordt over het algemeen uitgevoerd zoals reeds beschreven in paragraaf 1 van deze bijlage. Na de immunochemische reactie wordt van alle standaarden en monsters spectrofotometrisch de absorptie gemeten. Aan de hand van een ijkcurve kan dan vervolgens de concentratie van het betreffende analiet in de monsters berekend worden.

Voor een ijkcurve wordt de absorptie van de 0-standaard op 100 % gesteld (% B<sub>0</sub>). De absorpties van de andere standaarden worden als % B/B<sub>0</sub> uitgedrukt. Voor de maken van een ijkcurve zijn verschillende methoden beschikbaar, die zijn opgenomen in diverse handboeken voor immunoassays [2-5]. De meest geschikte methode voor de bepaling van zeer uiteenlopende concentraties is de logit-log methode, die ook aanbevolen wordt in de DIN-normen. Voor immunoassays wordt de aantoonbaarheidsgrens over het algemeen gedefinieerd als de concentratie die een absorptie van 90% B/B<sub>0</sub> geeft.

In de tabellen 2.2a en 2.2b zijn voor de, in paragraaf 2 van deze bijlage, opgenomen (groepen van) verbindingen de laagste, door de producenten aangegeven, detectielimieten weergegeven. De tabellen geven tevens aan hoe deze limiet door de producenten is gedefinieerd, wat (ca.) het werkgebied van de assay is en voor welk type test van welke producent deze gegevens gelden. Aangezien het verder van groot belang is dat de kruisreactiviteit van een specifieke immunoassay bekend is, is bovendien aangegeven waar dit het geval is. Zoals uit de, in tabel 2.1 opgenomen, gegevens al bleek kan de kruisreactiviteit voor assays die, voor dezelfde verbinding maar door verschillende producenten, op de markt zijn gebracht aanzienlijk verschillen.

Tabel 2.2a Groepspecifieke immunoassays

Analiët	Detectie- limiet (DL) [µg/l]	Definitie DL	Werkgebied	Info bron (producent)	Type test	Standaard
BTEX *	600	-	0.6 - 10 mg/l	D-Tech (Merck)	-	-
Cyclodiënen *	0,5	90% B <sub>0</sub>	0 - 100 µg/l	Millipore	Buizen	-
PCB *	0,2	90% B <sub>0</sub>	0 - 10.0 µg/l	Baker	Buizen	Araclor 1254
PAK •	5	-	5.0 - 500 µg/l	Quantix, D-Tech (Merck)	Diversen	-
RDX (explosieven) *	5	-	5.0 - 60.0 µg/l	D-Tech (Merck)	-	-
TNT *	5	-	5.0 - 60.0 µg/l	D-Tech (Merck)	-	-
TPH *	500	-	0.5 - 500 mg/l	Quantix	Plate	-
Triazine *	0,02	90% B <sub>0</sub>	0 - 2.0 µg/l	Millipore, Quantix, Agri	Diversen	Veelal atrazine
Ureumherbicide *.c	0,04	LDD	0 - 2.0 µg/l	Millipore	Plate	Chlortoluron

a: gegevens m.b.t. kruisreactiviteit zijn bekend; b: gegevens m.b.t. kruisreactiviteit slechts ten dele bekend; c: de specificaties zijn d.m.v. eigen metingen (Elti-support) bevestigd.



## Bijlage 2

Tabel 2.2b Stofspecifieke Immunoassays.

Analiët	Detectielimiet (DL) [ $\mu\text{g/l}$ ]	Definitie DL	Werkgebied	Info bron (producent)	Type test
2,4-D <sup>a,c</sup>	0,1	90% B0	0 - 20.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
2,4-D <sup>a,c</sup>	0,7	90% B0	0 - 50 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Acetochlor <sup>a</sup>	0,04	90% B0	0 - 10.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Alachlor <sup>a</sup>	0,05	90% B0	0 - 5.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore en Baker	Diversen
Aldicarb <sup>a,c</sup>	0,25	90% B0	0 - 100 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Atrazine <sup>a,c</sup>	0,006	95% B0	0 - 2.0 $\mu\text{g/l}$	Ensys Europe (Ltd)	-
Atrazine <sup>a,c</sup>	0,05	90% B0	0.05 - 2 a 5 $\mu\text{g/l}$	Millipore, Baker, Quantix en Agri.	Diversen
Benomyl/Carbendazim <sup>a</sup>	0,1	90% B0	0 - 5.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Benomyl/MBC 1,0 <sup>a</sup>	0,05	-	0.05 - 1.6 $\mu\text{g/l}$	Quantix	Plate
BTEX <sup>a</sup>	250	-	0.25 - 60.00 mg/l	Quantix	Plate
Captan <sup>a</sup>	10	90% B0	0 - 3.00 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Carbaryl <sup>a</sup>	0,25	90% B0	0 - 5.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Carbendazim <sup>a</sup>	0,1	90% B0	0 - 10.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Diversen
Carbofuran <sup>a</sup>	0,056	90% B0	0 - 5.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Chloorthalonil <sup>a</sup>	0,07	90% B0	0 - 5.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Chlorpyrifos <sup>a</sup>	0,1	90% B0	0 - 3.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Chlorpyrifos-ethyl <sup>a</sup>	0,08	LDD	0 - 1.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Chlorsulfuron <sup>a</sup>	0,04	85% B0	0 - 0.8 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Cyanazine <sup>a</sup>	0,035	90% B0	0 - 3.0 ng/l	Baker	Buizen
Diazinon <sup>a</sup>	0,022	85% B0	0 - 500 ng/l	Millipore	Plate
Imazapyr <sup>a</sup>	0,15	LDD	0 - 30.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Imazaquin <sup>a</sup>	5	-	5.0 - 80 $\mu\text{g/l}$	Quantix	Plate
Isoproturon <sup>a,c</sup>	0,009	-	0 - 2.0 $\mu\text{g/l}$	Ensys Europe (Ltd)	-
Isoproturon <sup>a,c</sup>	0,02	85% B0	0 - 0.50 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Metalaxyl <sup>a</sup>	0,05	90% B0	0 - 2.5 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Metolachlor <sup>a</sup>	0,05	90% B0	0 - 5.0 ng/l	Baker	Buizen
Metsulfuron-methyl <sup>a</sup>	0,02	85% B0	0 - 500 ng/l	Millipore	Plate
Nicotine <sup>a</sup>	4	85% B0	0 - 1000 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Paraquat <sup>b</sup>	0,018	90% B0	0 - 0.150 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate (b)
Parathion-ethyl <sup>a</sup>	0,05	50% B0	0 - 4.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
Parathion-methyl <sup>a</sup>	0,03	85% B0	0 - 4.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	Plate
PCP RISC <sup>a</sup>	5	-	0 - 2.0 $\mu\text{g/l}$	Ensys Europe (Ltd)	-
Pentachloorfenol <sup>a</sup>	0,06	90% B0	0 - 10.0 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
Procymidon <sup>a</sup>	0,8	90% B0	0 - 100 $\mu\text{g/l}$	Baker	Buizen
TNT (in water) <sup>a</sup>	0,05	-	0.05 - 2000 $\mu\text{g/l}$	Quantix	Plate
Triasulfuron <sup>a</sup>	0,04	85% B0	0 - 1.0 $\mu\text{g/l}$	Millipore	plate
Trifluralin 8,0 <sup>a</sup>	1	-	1.0 - 40 $\mu\text{g/l}$	Quantix	Plate

a: gegevens m.b.t. kruisreactiviteit zijn bekend; b: gegevens m.b.t. kruisreactiviteit slechts ten dele bekend; c: de specificaties zijn d.m.v. eigen metingen (Elti-support) bevestigd.

Verdere specificaties van commerciële immunoassaykits variëren. Voor de eisen die aan een betrouwbare, specifieke immunoassay gesteld worden, kan verwezen worden naar de DIN-normen. Daarin zijn o.a. waarden opgenomen voor de detectielimiet gebaseerd op de EU-norm van 0,1  $\mu\text{g/l}$  per pesticide, precisie (intra- en interassay variatiecoëfficiënt), betrouwbaarheid (kruisreactiviteit) en

matrixeffecten. Opgemerkt moet worden dat wat betreft de specificaties voor immunoassays deze eigenlijk alleen bij de RapidAssays van J.T. Baker voldoende worden vermeld.

#### 4. Commerciële beschikbaarheid

Uitgesplitst naar producent zijn de volgende stofs specifieke immunoassays beschikbaar:

##### Millipore, Postbus 166, 4870 AD, Etten-Leur.

Plate kits: Acetochlor, Alachlor, Aldicarb(Aldicarb sulfon als standaard), Atrazine (monoclonaal), Carbendazim, Chlorpyrifos-ethyl, Chlorsulfuron, Diazinon, 2,4-D, Imazapyr, Isoproturon, Metalaxyl, Metsulfuron-methyl, Nicotine, Parathion-methyl, Parathion-ethyl, Paraquat(Precisie, recovery en lineariteit zijn bekend), Triasulfuron en Triazine HS.

Buizen kits voor pesticiden (veldtest):

Alachlor, Aldicarb, Carbendazim (MCB), Carbofuran, 2,4-D en Procymidon (in wijn).

Quantitube kits voor pesticiden:

Alachlor (Recovery, lineariteit en precisie zijn bekend), 2,4-D(Recovery, lineariteit en precisie zijn bekend) en Metolachlor.

Tube kits voor contaminanten:

BTEX en Pentachloorfenol.

##### J.T. Baker, Postbus 1, 7400 AA, Deventer.

Tube kits voor pesticiden:

Alachlor (Recovery en precisie zijn bekend), Aldicarb(Recovery en precisie zijn bekend), Atrazine (in gras en onkruid, ook: water, Recovery en precisie zijn bekend), Benomyl/Carbendazim(Recovery en precisie zijn bekend), Captan(Recovery en precisie zijn bekend), Carbaryl(Recovery en precisie zijn bekend), Carbofuran(Recovery en precisie zijn bekend), Chloorthalonil (Recovery en precisie zijn bekend), Chlorpyrifos(Recovery en precisie zijn bekend), Cyanazine (Recovery en precisie zijn bekend), 2,4-D(Recovery en precisie zijn bekend), Metolachlor (Recovery en precisie zijn bekend), PCB (araclor 1254 als standaard, Recovery en precisie zijn bekend), Pentachloorfenol(Recovery en precisie zijn bekend) en Procymidon (Recovery en precisie zijn bekend).

##### Quantix, 700 Rt 130, North-Suite 203, Cinnaminson, NJ 08077, USA.

Plate kits: Alachlor, Atrazine 0,1 HS, Atrazine (1,0 Kit), Benomyl/MBC 1,0, BTEX, Chlorothalcnil 1,0, Imazaquin, Metolachlor, TNT (in water) en Trifluralin 8,0.

##### Agri-diagnostics, 2611 Branch Pike, Cinnaminson NJ 08077, USA.

Alachlor 2,0 (Precisie is bekend), Atrazine 0,1HS(Precisie is bekend) en Metolachlor 2,0 (Precisie is bekend).

##### Ensys Europe (Ltd), Suite 17, The Old Power Station, 121 Mortlake High Street, London SW 14 8SN.

Atrazine (reproduceerbaarheid is bekend), Isoproturon(reproduceerbaarheid is bekend) en PCP RISC (reproduceerbaarheid is bekend).

## Bijlage 2

Uitgesplitst naar producent zijn de volgende groepspecifieke immunoassays beschikbaar:

### Millipore:

Plate kits: Cyclodiënen, Triazine en Ureumherbicide.

Buizen kits voor pesticiden (veldtest):

Cyclodiënen en Triazine.

Quantitube kit voor pesticiden:

Triazine (Recovery, lineariteit en precisie zijn bekend).

Tube kit voor contaminanten:

TPH (aardolie).

### Quantix:

Plate kits: PAK, PAK (veldtest), TPH, TPH (veldtest), Triazine 0,1 HS en Triazine 3,0.

### Agri-diagnostics:

Triazine 0,1HS (Precisie is bekend) en Triazine 1,0 (Precisie is bekend).

### D-Tech (Merck), Frankfurterstr. 250, 64271 Darmstadt, Duitsland.:

EX, PAH (veldtest), RDX (explosieven) en TNT.

## ENZYMASAYS

### 1. Principe

Het detectieprincipe van de meeste enzymassays met een (potentiële) milieutoepassing berust op het monitoren van de substraatomzetting [Guibault, 1984; Lam and Malikin, 1994; Byfield and Abukneska, 1994]. Daarbij kan ofwel het verdwijnen van het substraat, dan wel het ontstaan van de producten gemeten worden; fotometrisch, potentiometrisch, amperometrisch, titrimetrisch. Indien in een toegevoegd monster één of meerdere verbindingen aanwezig zijn die de enzymwerking remmen, dan leidt dit tot een afname van de substraatomzetting en dus tot een afname van het gemeten signaal t.o.v. de standaard. Omdat enzymsystemen een katalytische functie hebben in de substraatomzetting, met een soms zeer grote "turn over" [Guibault, 1984; Lam and Malikin, 1994; Jager, 1995], kan een relatief geringe hoeveelheid van de remmende verbinding(en) leiden tot een relatief grote signaalafname. Dit aspect beïnvloedt de gevoeligheid van enzymassays veelal positief.

Naast het gebruik van enzymen in in-vitro enzymassays, wordt het principe van enzymremming ook toegepast in een aantal alternatieve, veelal afgeleide, toepassingen. De research naar de mogelijke toepassing van enzymen in enzym-sensoren en geïmmobiliseerde enzymreactoren (Immobilized Enzyme Reactors: IMER's) voor toepassing in FIA en vloeistof chromatografische technieken is de laatste jaren sterk gestegen [Byfield and Abukneska, 1994; Marty and Mionetto, 1994; Marco-Varga et al., 1994a; Dominiguez and Ortega, 1994; Dzydevich et al., 1994; Schwedt and Stein; Wollenberger et al., 1994; Günther and Bilitewski, 1995]. Een voorwaarde voor dergelijke toepassingen is veelal dat de substraatomzetting direct elektrochemisch, of spectroscopisch gemonitord kan worden. Veelal wordt voor dergelijke toepassingen derhalve gekozen voor een gemodificeerd substraat dat directe detectie met, reeds bestaande, ionselectieve elektroden of spectroscopische analysemethoden mogelijk maakt.

In het kader van een EC project<sup>1</sup> wordt momenteel o.a. research verricht t.b.v. de ontwikkeling van sensoren op basis van (Acetyl)choline-esterase remming [Marty and Mionetto, 1994] en thyrosinase inductie [Marco-Varga et al., 1994a; Dominiguez and Ortega, 1994]. Veelal zijn dergelijke methoden echter nog niet ver genoeg ontwikkeld om commercieel toegankelijk te zijn.

Met uitzondering van de methode op basis van thyrosinase inductie (uitgaande van [Jager, 1995] moet ook hier echter een eenvoudige enzymassay mogelijk zijn), zijn alle hieronder beschreven technieken eenvoudige in-vitro enzymassays.

---

<sup>1</sup> EC Environment Programme (1991-1994), Area II.1 "Assessment of environmental quality and monitoring", EC DG XII, Brussels.

## Bijlage 3

### 2. (Het pakket van) "Verbindingen" waar de methode betrekking op heeft

Tabel 3.1 geeft een overzicht van de verbindingen waar de methode betrekking op heeft.

Tabel 3.1 Verbindingen waar de methode betrekking op heeft

Assay No.	Enzym(systeem)	detectie principe	Toepassingsgebied (remmers)
1	- Acetylcholine-esterase <sup>*</sup>	- Fotometrisch <sup>*</sup>	- Organofosfor en carbamaat pesticiden
2	- Urease <sup>*</sup>	- Potentiometrisch (via pH verandering)	- Zware metaal zouten (o.a. Hg (II) en Cu (II))
3	- Aldehydedehydrogenase <sup>*</sup>	- Fotometrisch	- Dithiocarbamaat fungiciden (o.a. Zineb, Maneb, Thiram)
4	- Thyrosinase <sup>b</sup> **	- Amperometrisch <sup>c</sup> of fotometrisch	- Phenol, cresol, en diverse gesubstitueerde - en diphenolen
5	- Horseradish peroxidase (HRP) <sup>d</sup> ***	- Chemiluminescentie	- Elektronen acceptoren en antioxydanten; hoge correlatie met CZV en BZV

- a: Verschillende fotometrische, alsmede andere detectieprincipes, zijn tevens benut om de methode geschikt te maken voor sensor-toepassingen (incl. dipsticks) en automatisering in FIA systemen;
- b: de analieten treden op als substraat voor het enzym (geen remming);
- c: De aandacht gaat momenteel met name uit naar gemodificeerde ionselectieve elektroden op basis van thyrosinase type enzymen;
- d: De methode wordt momenteel door een aantal afdelingen van de NRA (UK) uitgetest.

\* [Obst, 1995];

\*\* [Jager, 1995; Marco-Varga et al., 1994a; Domínguez and Ortega, 1994];

\*\*\* [Billings et al., 1994].

### 3. Indicatie van gevoeligheid en performance:

Tabel 3.2 geeft een overzicht van de gevoeligheid en performance.

Tabel 3.2 Gevoeligheid en performance

Assay No.	Verbinding	det. lim. (DL) [ $\mu\text{g/l}$ ]	bereik (orden)	stnd. deviatie (bij 10 x DL)
1	Paraoxon	0.05	>3	ca. 5%
	Paraoxon equivalenten	<1		
2	Hg(II)	7 <sup>a</sup>	-	ca. 12%
	Cu(II)	5 <sup>a</sup>		ca. 12%
3	Zineb	>1	-	-
	Maneb	>1	-	-
	Thiram	>50	-	-
4	Phenol <sup>b</sup>	0.3	>2	-
5	Pb(II)	10000	>2 <sup>c</sup>	-
	CN	100		
	pesticiden	1000		

a: EC<sub>50</sub> waarden;

b: Voor o.a. p-cresol, 4-chloor-3-methylphenol, 4-chloorphenol, 2,4-dimethylphenol, 2-amino-4-chloorphenol en 3-chloorphenol wordt, ten opzichte van phenol, verkregen die afloopt van 54% tot 0.2% [Dominiquez and Ortega, 1994];

c: De correlatie met CZV ( $R \approx 0.96$ ,  $N = 10$ ) en BZV ( $R \approx 0.91$ ,  $N = 10$ ) strekt zich over ten minste twee orden uit.

Interferenties a.g.v. de aanwezigheid van een directe remmende werking van niet genoemde klassen van verbindingen zullen over het algemeen vrij gering zijn, omdat de specificiteit van enzymen bijzonder groot is [Guibault, 1984; Lam and Malikin, 1994; Jager, 1995]. Wel kunnen relatief eenvoudig interferenties a.g.v. pH afwijkingen, temperatuur schommelingen, of indirecte remming door andere matrixcomponenten optreden [Guibault, 1984; Lam and Malikin, 1994; Jager, 1995; Obst and Holzappel-Pschorn, 1988]. Daarbij dient opgemerkt te worden dat enzymen het best werken bij een specifieke pH en temperatuur en in media die de enzymstructuur niet verstoren. Daarnaast moet rekening gehouden worden met enzymstabiliteit; enzymen verouderen gemakkelijk als ze niet goed gekoeld bewaard worden en bovendien kan de activiteit nogal verschillen van batch tot batch.

Mogelijk kunnen een aantal van deze beperkingen worden verholpen door tests te automatiseren of te normaliseren, waarbij schaling tegen een standaard en bepaling van blanco's een belangrijke rol spelen [Obst and Holzappel-Pschorn, 1988]. Gebruikmaken van preconcentratietechnieken kan mogelijk zowel een oplossing bieden voor de soms beperkte gevoeligheid als voor de verstoring door diverse matrixcomponenten en buffercapaciteit van het monstermedium.

### 4. Indicatie van (commerciële) toegankelijkheid

Geïsoleerde enzymen worden door een groot aantal producenten commercieel op de markt gebracht. Daarnaast zijn sommige enzymtesten ook als testkit, dipstick, of geïmmobiliseerd op een

### Bijlage 3

vast dragermateriaal verkrijgbaar. Een complete testkit voor choline-esterase remming die door Boehringer Mannheim op de markt werd gebracht is recentelijk, wegens onvoldoende belangstelling, uit het programma gehaald [Jager, 1995]. Wel wordt een "dip stick" testkit op basis van acetylcholine-esterase remming nog door Neogen (USA) op de markt gebracht (\$ 205 voor 25 bepalingen). Daarnaast wordt acetylcholine-esterase remming door veel commerciële laboratoria in het standaard analysepakket aangeboden (bijv. bij Omegam (Amsterdam), op basis van NEN 6526, fl 260,00 per bepaling). Geen van de resterende beschreven testen is standaard in het analysepakket van commerciële laboratoria opgenomen. Tabel 3.3 geeft een overzicht.

Tabel 3.3 Commerciële toegankelijkheid

No.	Produkt	producent	kosten (per 100 milligram)	responstijd
1	Acetylcholine-esterase	Boehringer Mannheim	ca. fl 200,00 <sup>a</sup>	< 1 uur
2	Urease	Boehringer Mannheim	ca. fl 150,00 <sup>a</sup>	< 1 uur
3	Aldehyde dehydrogenase	Boehringer Mannheim	ca. fl 2.300,00 <sup>a</sup>	< 1 uur
4	Thyrosinase	Diverse mogelijkheden	-	seconden tot minuten
5	Horseradish peroxidase	Boehringer Mannheim	ca. fl 750,00 <sup>a</sup>	-
5	complete test kit (op basis van HRP)	Aztec (UK)	ca. £ 1 per bepaling <sup>b</sup>	ca. 5 min

a: Voor de test op basis van Urease kunnen tot maximaal ca. 3000 bepalingen met 100 mg urease uitgevoerd worden (berekend op basis van [Obst and Holzappel-Pschorn, 1988]);

b: Voor de bepalingen is tevens een luminometer noodzakelijk. Deze wordt, gezamenlijk met reagentia voor ca. 100 tests, voor ca. £ 5000 op de markt gebracht.

Er moet rekening mee gehouden worden dat er voor het uitvoeren van de tests nog enige andere reagentia, substraat oplossingen, e.d. nodig zijn. De kosten voor deze reagentia, alsmede de kosten voor manuren zijn niet in het overzicht opgenomen.

## CHEMISCHE SENSORTECHNIKEN

### 1. Principe

Zoals in paragraaf 2.4.1 al werd beschreven, wordt de selectiviteit van een sensor over het algemeen bepaald door een "interface" (de selector), die in staat is om, selectief met een bepaalde verbinding of groep van verbindingen, een interactie aan te gaan. Het type transducer, hoewel sterk gerelateerd aan de keuze van de selector, is in dit opzicht van minder belang.

Bij Chemische sensoren is de selector gebaseerd op een (fysisch-)chemisch principe (complex vorming, elektrochemische reacties, chemi- of fysisorptie, ionen uitwisseling, membraan transport, catalyse [Ache, 1993]).

Biosensoren onderscheiden zich van Chemische sensoren door het feit dat de selector uit een materiaal bestaat dat biologisch van oorsprong is [Sethi, 1994]. De materialen die daarbij gehanteerd worden omvatten o.a.: intacte cellen, complete micro-organismen of organellen (zie bijlage bioassays); antilichamen of antigenen (zie bijlage immunoassays), of geïsoleerde enzymen of enzymsystemen (zie bijlage enzymassays). In incidentele gevallen wordt ook gebruik gemaakt van o.a. receptoren en andere biologische membraansystemen (niet in deze rapportage opgenomen). Aangezien de specifieke aspecten die voor biosensoren/bioselector-systemen gelden in voldoende mate worden afgedekt in de bijlagen m.b.t. de assays die op dezelfde principes gebaseerd zijn, worden deze in de onderhavige bijlage niet beschreven.

Ook losse (gemodificeerde) ionselectieve elektroden (ISE) kunnen tot op zekere hoogte als sensoren aangeduid worden. Bovendien, worden micro analyse-systemen af en toe als sensorsystemen gepresenteerd. M.b.t. ISE is hier wel een summier overzicht opgenomen. Voor wat betreft micro analyse-systemen, echter, wordt verwezen naar de paragraaf "Flow Injectie Analyse" (FIA).

### 2. (Het pakket van) "Verbindingen" waar de methode betrekking op heeft:

Het hierna gepresenteerde overzicht van toepassingsgebieden voor verschillende sensortypen werd opgesteld a.d.h. van informatie uit de referenties [Jantra et al., 1994; Jantra, 1992; Solsky, 1990; Briggs, 1994; Lynggaard-Jensen A., 1994; Mittenzwey, 1994; Yamauchi S., 1991; Vaihinger and Goepel, 1991; Flores and Lorenzo; Olson and Tsai, 1992; Niessner, 1991; Olthuis, 1993; Quist, 1994; Oort, 1993; Sprangers et al., 1992; Leeuwis et al., 1990] en informatie die door een aantal experts op dit gebied (Lambeck en Olthuis: TU Twente, van Veen en Cheng: TNO en Sprangers: 3T) werd aangeleverd (tabel 4.1).



## Bijlage 4

Tabel 4.1 Verbindingen waar de methode betrekking op heeft

Type omvormer	Selector principe(s)	Toepassingsgebied
Spectroscopisch: - Absorptie	Membraanpermeatie, complex vorming, indicator reactie <sup>b</sup> .	Diverse ionen (o.a.: CN <sup>-</sup> , HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> , Hg <sup>+</sup> ).
- Fotoacoustisch	Indicator reactie, Spectrale karakteristieken.	Diverse (zware) metalen en actiniden, alsmede enige organische micro's.
- Optothermisch	Indicator reactie, spectrale karakteristieken.	Diverse (zware) metalen, anionen (o.a. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ), alsmede enige organische micro's.
- Fotopyroelectrisch	Indicator reactie.	Diverse ionen (o.a. NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> en PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ).
- Fluorescentie	Eigen fluorescentie, Complex vorming,	Div. PAK (o.a. benzo[a]pyreen) en metalen (o.a. Zn <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )
- Chemiluminescentie	Indicator reactie <sup>a,b</sup> . Uitsluitend FIA toepassingen.	Diverse metalen en anionen in FIA.
- (Surface enhanced) Ramanverstrooiing	Vooralsnog slecht zeer beperkt in sensortoepassingen.	Diverse organische micro's
Halfgeleiders: - Ladingsdichtheid (ISFET)	Ionenwisseling, complexatie <sup>c</sup> , indicator reactie.	pH, Cl <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> en verschillende lichte metaalionen (K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )
Akoestisch - Piëzoelectrische resonantie	o.a. Membraanextractie.	Zware metalen, NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , H <sub>2</sub> S, CN <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , alcoholen
Chemisch gemodificeerde elektroden (Ion Selective Electrodes (ISE))	Membraanpermeatie, ionenwisseling, REDOX koppels.	Metalen, halogeniden en diverse andere anionen en kationen (o.a. CN <sup>-</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SCN <sup>-</sup> )

<sup>a</sup>: o.a. Fujiwarareactie voor meervoudig gechloteerde organische verbindingen;

<sup>b</sup>: o.a. op basis van Chromo-ionoforen;

<sup>c</sup>: o.a. op basis van ionoforen.

Er is een toenemende interesse voor spectroscopische absorptieve en fluorescente technieken, waarbij gebruik gemaakt wordt van lichtgeleiders (optische fibers, dunne film lichtgeleiders, e.d.). Daarbij wordt vaak gebruik gemaakt van principes als (diffuse) reflectie en evanescente penetratie. Chemische sensortechnieken, die gebruik maken van deze principes, bieden zeker enige interessante mogelijkheden [Quist, 1994]. Over het algemeen echter zijn potentiële toepassingen nog in een te vroeg stadium van ontwikkeling om op te nemen binnen het kader van de onderhavige studie.

### 3. Indicatie van gevoeligheid en performance

Op basis van de gehanteerde literatuur moet er van uit gegaan worden dat de meeste van de hier beschreven technieken nog in een ontwikkelingsstadium verkeren. De analytische prestaties van deze technieken zijn derhalve veelal slechts beperkt onderzocht en gedocumenteerd.

Over het algemeen kan gesteld worden dat, met name voor de bepaling van ionen (macro-ionen, zware metalen en nutriënten), de gevoeligheid van een aantal van de geïnventariseerde sensoren (in een waterig medium) redelijk overeenkomt met de gevoeligheid van de algemeen geaccepteerde analytische methoden. Het lineaire bereik en de analytische onzekerheid zijn slechts voor een zeer beperkt aantal technieken bekend. Bij de bepaling van vrijwel alle ionen wordt aangegeven dat interferenties, a.g.v. de aanwezigheid van andere ionen, kunnen optreden. Daarnaast kunnen in een aantal gevallen ook interferenties optreden als gevolg van "bulkparameters" zoals temperatuur, pH, humuszuren (UV absorptie) e.d. Waar geen interferenties gerapporteerd worden, zijn deze veelal ook niet of onvoldoende onderzocht.

Ook voor de commercieel verkrijgbare ISFET-sensoren konden de analytische prestaties (gevoeligheid, lineariteit, nauwkeurigheid en gevoeligheid voor verstoringen) niet eenvoudig uit de specificaties, of de beschikbare test-rapporten worden afgeleid.

### 4. Indicatie van (commerciële) toegankelijkheid

Vooralsnog lijken, uitgaande van de gehanteerde literatuur, chemische sensoren en sensoropstellingen slechts zeer beperkt "commercieel" beschikbaar te zijn<sup>1</sup>. Mogelijk zal in individuele situaties echter wel gebruik gemaakt kunnen worden van sensoren of sensoropstellingen die bij verschillende onderzoekinstellingen aanwezig zijn, of van sensoren die in een demonstratie-stadium verkeren.

Algemeen kan verder gesteld worden, dat voor de toepassing van chemische sensoren naast de "feitelijke sensor" veelal nog enige specifieke randapparatuur noodzakelijk is. Het gaat daarbij bijvoorbeeld om excitatiebronnen (lampen, lasers), monochromatoren, photoncounters, versterkers, dataverwerkingsapparatuur e.d. Dergelijke apparatuur is over het algemeen wel commercieel beschikbaar. De aanschaf van dergelijke apparatuur kan echter leiden tot hoge startkosten. Voor die spectroscopische sensortechnieken die gebaseerd zijn op het gebruik van lasers, zullen de startkosten zeker bijzonder hoog zijn (enige honderden Kfl). Onderzoek op het gebied van diode lasers, waarvan de kosten aanzienlijk lager liggen, kan nog tot een aanzienlijke verlaging van deze startkosten leiden.

---

<sup>1</sup> Ionselectieve elektroden voor verschillende metalen, halogeniden en andere kationen en anionen vormen hierbij een uitzondering.

## Bijlage 4

Tabel 4.2 Commerciële toegankelijkheid

Type sensor	producent	kosten	responstijd
ISFET sensoren voor pH en lichte metalen ( $K^+$ , $Na^+$ , $Ca^{2+}$ )	Sentron	.. <sup>b</sup>	.. <sup>c</sup>
Combinatie ISE/MOSFET sensoren voor pH, $Cl^-$ en lichte metalen	IBP Electronic	Enkele duizenden guldens per sensor	
ISE voor diverse kationen en anionen	Metrohm, Orion, Philips	Vooralsnog geen gegevens	.. <sup>c</sup>

a: Niet commercieel beschikbaar;

b: Deze sensoren verkeren momenteel nog in een demonstratie stadium. Kosteninformatie is derhalve nog niet opgevraagd;

c: Veelal seconden tot minuten.

Tot slot dient nog vermeld te worden dat sensorprincipes, waarbij reagentia toegevoegd moeten worden voor het detectiemechanisme, of de regeneratie van de sensor, veelal een Flow Injectie Analytische (FIA) equivalent kennen. Dergelijke FIA systemen verkeren veelal al in een verder gevorderd stadium van ontwikkeling (zie bijlage "Flow Injectie Analyse").

## TOTAAL-ORGANO 'ELEMENT' BEPALINGEN

### 1. Principe

Met behulp van een niet-specifieke extractie worden organische verbindingen uit water geëxtraheerd, waarna micro-coulometrisch het halogeen-gehalte (..OX), of het stikstof-gehalte (..ON) kan worden vastgesteld. Het fosfor-gehalte (..OP), of het stikstof-gehalte (..OS) kan vlamfotometrisch worden vastgesteld na omzetting tot fosfine, respectievelijk waterstofsulfide, en een gaschromatografische analyse.

Bij de extractie wordt een fysisch-chemisch goed gedefinieerd deel van het totaal aan organische verbindingen geëxtraheerd. Hierbij zijn verschillende extractie-methoden toepasbaar, elk met een eigen scala aan te extraheren verbindingen:

#### VO - X, N, P, S:

Vluchtige apolaire, met een gasstroom te extraheren verbindingen (gasstrip-analyse) die vervolgens in de gasstroom aan Tenax geadsorbeerd worden. Hoewel technisch mogelijk worden de VO - N, P en S bepalingen niet toegepast<sup>1</sup>.

#### EO - X, N, P, S:

Niet-vluchtige apolaire verbindingen, die met petroleum-ether extraheerbaar zijn.

#### XO - X, N, P, S:

Niet-vluchtige apolaire en zwak polaire verbindingen, die met XAD-hars geëxtraheerd worden; hierbij kan onderscheid gemaakt worden tussen verschillende XAD-harsen, en tevens kan de pH van het watermonster aangepast worden, zodat gesproken kan worden van neutrale verbindingen (b.v.  $XOX_7$ ) wanneer de extractie bij pH=7 wordt uitgevoerd, en van zure verbindingen (b.v.  $XOX_2$ ) wanneer de pH=7 extractie gevolgd wordt door een extractie bij pH=2. De XAD wordt geëluëerd met een organisch oplosmiddel. Het eluaat wordt voor de elementanalyse gebruikt.

#### AO - X, N, P, S:

Apolaire en zwak tot matig polaire verbindingen, die met actieve kool geadsorbeerd worden. In overeenstemming met de verschillende uitvoeringsvormen bij XO-X/N/P/S kan de extractie plaatsvinden bij verschillende pH's, al dan niet na elkaar, om zo een onderscheid te maken tussen neutrale, zure en eventueel basische organohalogenen verbindingen. Bij AOX en AOS wordt de actieve kool direct voor elementanalyse ingezet. Bij AON en AOP geldt dat deze alleen technisch uitvoerbaar zouden zijn na een elutie-stap met een geschikt oplosmiddel. Reductieve omzetting met waterstof (zie "ON" en "OP" elementanalyses) is in de aanwezigheid van kool niet mogelijk<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Voor vluchtige apolaire organostikstof-, organofosfor- en organozwavelverbindingen geldt dat hun aantal zeer beperkt is, en VON, VOP en VOS dan ook niet als indicatie-parameter gebruikt kunnen worden.

<sup>2</sup> Met een op deze manier uitgevoerde AON of AOP zou vooral organisch materiaal van natuurlijke herkomst gemeten worden (in nóg sterkere mate dan met XON en XOP), zodat ook deze parameter als indicator voor antropogene verontreiniging ongeschikt is.

## Bijlage 5

Behalve petroleum-ether bij EOX, EON en XAD-hars bij XOX, XON kan ook gebruik worden gemaakt van andere organische oplosmiddelen en andere vaste fase adsorbentia. Zo zal ethylaceetaat een groter deel van de matig polaire verbindingen extraheren dan petroleum-ether. Hiervoor bestaat echter geen vastgelegde procedure en is geen nader onderzoek uit de literatuur bekend. Ook voor alternatieve adsorbentia zijn geen procedures of onderzoeksresultaten uit de literatuur bekend.

### Elementanalyse (halogenen):

De meting geschiedt door de Tenax thermisch te desorberen (VOX), dan wel het extract (EOX en XOX) of het beladen adsorptiemiddel (AOX) bij temperaturen tussen 800 °C en 1000 °C te verbranden in een zuurstofrijke atmosfeer waarbij de met het organohalogeene overeenkomstige halogenides gevormd worden. Deze vormen met de in een waterige oplossing aanwezige zilver-ionen een neerslag van het zilverhalide, en vervolgens wordt de oorspronkelijke zilver-ionenconcentratie hersteld waarbij de hoeveelheid lading, die nodig is om deze zilver-ionen te genereren, bepaald wordt.

Opgemerkt wordt dat de respons voor organobroom- en organojood-verbindingen in het algemeen minder is dan voor organohalogeene-verbindingen (circa 60-90%, afhankelijk van de verbrandingsomstandigheden).

### Elementanalyse (stikstof):

De meting geschiedt door de organostikstof uit het extract bij 850 °C in een waterstof-atmosfeer om te zetten in ammoniak, wat in een aangezuurde waterige oplossing de pH verhoogt, waarna de hoeveelheid lading, die nodig is om de waterstof-ionenconcentratie op het oorspronkelijke niveau te brengen, met behulp van een micro-coulometrische titratie wordt bepaald.

### Elementanalyse (fosfor):

De meting geschiedt door de organofosfor uit het extract bij 1100 °C in een waterstof-atmosfeer om te zetten in fosfine, wat in een koude val verzameld wordt. Omdat bij de meting gelijktijdig waterstofsulfide gevormd wordt uit aanwezige organozwavelverbindingen, worden beide chromatografisch gescheiden op een korte gepakte kolom en vervolgens vlamfotometrisch bepaald. Met name de noodzaak van een scheiding maakt het systeem gecompliceerder dan bij de microcoulometrische bepalingen van organohalogeene en organostikstof het geval is.

Aangezien de omzetting tot fosfine slecht reproduceerbaar is, worden organofosfor-bepalingen in de praktijk vrijwel niet toegepast.

### Elementanalyse (zwavel):

De meting voor EOS en XOS geschiedt door de organozwavel uit het extract bij 1100 °C in een waterstof-atmosfeer om te zetten in waterstofsulfide, wat in een koude val verzameld wordt. Omdat bij de meting gelijktijdig fosfine gevormd wordt uit aanwezige organofosforverbindingen, worden beide chromatografisch gescheiden op een korte gepakte kolom en vervolgens vlamfotometrisch bepaald. Met name de noodzaak van een scheiding maakt, ook hier, het systeem gecompliceerder dan bij de microcoulometrische bepalingen van organohalogeene en organostikstof het geval is.

Voor AOS wordt de kool met de organozwavel-verbindingen onder oxidatieve omstandigheden omgezet in zwaveldioxide, waarna het daaruit gevormde sulfaat met behulp van een micro-coulometrische titratie bepaald wordt.

## 2. Verbindingen waar de methode betrekking op heeft

Afhankelijk van de extractieprocedure, wordt een breed pakket aan organohalogen-, organostikstof-verbindingen gemeten. In onderstaande tabellen worden per type elementanalyse en extractieprocedure enkele kenmerkende (groepen van) stoffen genoemd.

methode	doelstoffen
VOX	gehalogeneerde C1-C3 oplosmiddelen (dichloormethaan, tetrachlooretheen) gehalogeneerde apolaire C2-C6 verbindingen (chloorpentaan, chloorcyclohexaan) vluchtige gehalogeneerde aromaten (mono-, di-, tri- en tetra-chloorbenzenen) vluchtige apolaire chloringsprodukten (chloroform, bromoform, dichlooracetonitril) vluchtige gehalogeneerde bestrijdingsmiddelen (dichloorpropeen, methylbromide)
EOX	gehalogeneerde apolaire, niet vluchtige verbindingen (chloornaftaleen, tetra-, penta- en hexachloorbenzeen, "klassieke" organochloor bestrijdingsmiddelen zoals HCH-isomeren, drins en DDT, PCB's, sommige chlooranilines)
XOX	gehalogeneerde zwak polaire, niet vluchtige verbindingen (gechloreerde bestrijdingsmiddelen zoals atrazin, diuron en dichlobenil, chlooranilines, chloorfenolen, chloornitrobenzenen, zwak zure chloorcarbonsuren)
AOX	gehalogeneerde zwak tot matig polaire verbindingen; grote overlap met XOX met daaraan toegevoegd meer polaire verbindingen en vluchtige verbindingen (chloorazijnzuur, chlooralcoholen, -ketonen en -aldehyden)

methode	doelstoffen
EON	apolaire organostikstofverbindingen (anilines, pyridines, alifatische amines, benzidines, azo-verbindingen); de organostikstofverbindingen uit de "USEPA 129 priority pollutants list" worden hiermee bepaald
XON	zwak polaire organostikstofverbindingen (veel bestrijdingsmiddelen zoals atrazin en diuron, carbamaten, (di)nitrofenolen, chloornitrobenzenen, nitroanilines, zwak zure nitro- en aminocarbonzuren)

methode	doelstoffen
EOP	apolaire organofosforverbindingen waaronder enkele bestrijdingsmiddelen zoals parathion en malathion, trifenyfosfinoxide- en -sulfide (TPPO resp. TPPS)
XOP	zwak polaire organofosforverbindingen (veel organofosforbestrijdingsmiddelen zoals ethoprofos, azinphos en dimethoaat, trialkylfosfaten, thiofosfaten)

## Bijlage 5

methode	doelstoffen
EOS	apolaire, niet vluchtige organozwavelverbindingen waaronder apolaire bestrijdingsmiddelen zoals malathion, parathion, endosulfan, thioethers, alkylsulfides, thiocyanaten
XOS	zwak polaire, niet vluchtige verbindingen (bestrijdingsmiddelen zoals bentazon, azinphos en methabenzthiazuron, thiolen, benzeensulfonamides, thiazolen, sulfon-verbindingen)
AOS	zwak tot matig polaire verbindingen; grote overlap met XOS met daaraan toegevoegd meer polaire verbindingen (sulfonaten, sulfonzuren)

### 3. Gevoeligheid en performance

De gevoeligheid van de geselecteerde methode voor een bepaalde stof hangt sterk af van het halogeengehalte, stikstofgehalte, fosforgehalte, of het zwavelgehalte, de hoeveelheid in bewerking genomen monster en het extractie-rendement. Wordt deze laatste op 100% gesteld, dan gelden de onderstaande aantoonbaarheidsgrenzen (richtwaarden), uitgedrukt als respectievelijk  $\mu\text{gCl/l}$ ,  $\mu\text{gN/l}$ ,  $\mu\text{gP/l}$ , en  $\mu\text{gS/l}$ .

Voor lineariteit<sup>3</sup> en herhaalbaarheid gelden eveneens als indicatie de waarden uit onderstaande tabellen.

methode	det.lim [ $\mu\text{gCl/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
VOX	0,1	3	10
EOX	0,1	3	10
XOX	0,5	3	20
AOX	5	2	10

methode	det.lim [ $\mu\text{gN/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
EON	0,1	3	10
XON	0,1	3	20

methode	det.lim [ $\mu\text{gP/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
EOP	0,1	3	10
XOP	0,5	3	20

<sup>3</sup> De vlamfotometrische respons voor waterstofsulfide is in principe kwadratisch. Met behulp van een elektronische linearizer wordt voor EOS en XOS een lineair verband verkregen.

methode	det.lim [µgS/l]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
EOS	1	2	10
XOS	1	2	20
AOS	10-50 <sup>*)</sup>	3	10

<sup>\*)</sup> wordt in sterke mate bepaald door het zwavel gehalte van de gebruikte actieve kool

#### 4. Indicatie toegankelijkheid

Commerciële apparatuur is verkrijgbaar voor VOX, EOX, EON, EOS en AOX zowel wat betreft de extractie-procedure als ook de elementanalyse. Apparatuur is leverbaar van onder andere Euroglas, Shimadzu en Dohrman. Alle genoemde technieken, alsmede AOS, zijn voldoende uitontwikkeld. Echter, alleen de VOX, EOX en AOX worden op diverse laboratoria routinematig toegepast. De EOP is onvoldoende uitontwikkeld om routinematig toegepast te worden (uitsluitend onderzoeksapparatuur is leverbaar: Kiwa/Euroglas). Met uitzondering van de "..OX" bepalingen, is bovendien de betekenis voor de waterkwaliteit veelal nog onvoldoende duidelijk.

De XOX-analyse wordt nog vrijwel niet toegepast. Toepassing van XOX vindt plaats daar waar in de XAD-isolaten ook andere bepalingen worden uitgevoerd zoals onderzoek naar specifieke organische microverontreinigingen met GC/MS. De XOX-metingen kunnen dan gecorreleerd worden met de GC/MS-metingen van individuele organohalogenverbindingen of mutageniteitsmetingen met de Ames-test. Voor hogere concentraties (>5 µg/l) levert de XOX-bepaling geen aanvullende informatie boven de AOX-bepaling. Alleen in het concentratie-gebied tussen 0,2 en 5 µg/l meet de XOX-bepaling ook meer polaire verbindingen, daar waar de EOX-bepaling alleen apolaire verbindingen meet. Voor oppervlaktewater en afvalwater lijkt de verdere ontwikkeling van XOX als zelfstandige groepsparameter dan ook niet zinvol, temeer daar de XAD-isolatie van grote volumina water een complexe en tijdrovende, en daarmee kostbare procedure is.

De XON-analyse wordt vrijwel niet toegepast. Weliswaar wordt hiermee een grote groep relevante antropogene stoffen gemeten, maar tegelijkertijd wordt ook het stikstof van natuurlijk organisch materiaal gemeten, waardoor de antropogene bijdrage meestal gemaskeerd wordt. XON correleert sterk met het DOC, vooral het XON bij een zure XAD-isolatie. Dit geldt in veel mindere mate voor het neutrale XON, die wel een duidelijkere indicatie geeft van verontreinigingen.

Ook de XOS is als techniek voldoende uitontwikkeld om routinematig toegepast te worden. Ook hier is echter de betekenis voor de waterkwaliteit nog onvoldoende duidelijk.



## Bijlage 5

Indicatie van looptijd (inclusief extractie-procedure) en analysekosten per bepaling:

methode	looptijd (min)	analysekosten (Fl.)
VOX	30	150
EOX	120	150
XOX	480	1000
AOX	120	200

methode	looptijd	analysekosten (Fl.)
EON	120	150
XON	480	1000

methode	looptijd	analysekosten (FL.)
EOP	150	300
XOP	500	1000

methode	looptijd	analysekosten (Fl.)
EOS	150	300
XOS	500	1000
AOS	120	200

NB 1. Uitgegaan is van een enkelvoudige bepaling zonder aanvullende kwaliteitscontroles. In het geval dat meer monsters worden geanalyseerd zal de totale looptijd vaak beperkt kunnen worden door de parallele uitvoering van de extractie-procedure. Er is evenmin rekening gehouden met het mogelijk gebruik van het verkregen extract voor meerdere chemische (groeps)bepalingen.

NB 2. Voor de XO X\N\P\S-analyse is uitgegaan van een groot-volume XAD-isolatie van 10-50 liter, zoals deze in de literatuur beschreven is. Bij schaalverkleining (0,5-1 liter) kan een aanzienlijke tijd- en kostenbesparing gerealiseerd worden.

### 5. Onderlinge relaties

Hoewel de samenstelling van elk watermonster anders is voor wat betreft de met VOX, EOX, XOX en AOX meetbare organohalogeenvverbindingen, verhouden zeer globaal voor oppervlaktewater de gehalten zich als volgt (AOX=100):

VOX = 15-50 (geldt alleen voor natuurlijke waters na chloring)

EOX = 2-5

XOX = 20-60, waarvan gelijke delen neutraal en zuur

AOX = 100

Meer informatie kan worden teruggevonden in de referenties bij deze bijlage:

[AWWA/Kiwa, 1988; van Loon en Hermens, 1995; Noij et al. 1989a; Noij et al., 1989b; NEN, 1991a; NEN, 1991b; ISO, 1989; Schnitzler en Sontheimer, 1982]



## TOTAAL ORGANOTINVERBINDINGEN (OSN/AAS)

### 1. Principe

Met behulp van een geschikt organisch oplosmiddel wordt een watermonster geëxtraheerd, waarna, na verder indampen, de organotinverbindingen in het extract met behulp van Atomaire Absorptie Spectroscopie (AAS) worden bepaald als totaal-organotingehalte.

De extractie gebeurt met petroleum-ether (PE) waarbij na indampen het monster met een factor 250 is geconcentreerd ten opzichte van het oorspronkelijke watermonster. Van het concentraat wordt een deel tezamen met een modifier (Palladium-zout) in de AAS gebracht en het signaal gemeten bij de absorptie-golflengte van tin. Het gemeten signaal geeft het totaal-organotingehalte uitgedrukt als tin. Voor meer informatie wordt verwezen naar [Flentge, 1995].

### 2. Verbindingen waar de methode betrekking op heeft

Met de methode worden alle met petroleum-ether extraheerbare organotinverbindingen gemeten.

methode	doelstoffen
OSn/AAS	apolaire organotinverbindingen, zoals de alkyl- en phenyl-tin bestrijdingsmiddelen

### 3. Gevoeligheid en performance

Daar deze methode weinig wordt toegepast zijn de gegevens over performance erg schaars. Gebaseerd op enige persoonlijke mededelingen is de onderstaande tabel samengesteld:

methode	det.lim [ $\mu\text{gSn/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
OSn/AAS	0,004	>2	?

### 4. Indicatie toegankelijkheid

Hoewel er weinig ervaring is met de methode als zodanig, worden de afzonderlijke onderdelen (extractie met PE en AAS-meting) routinematig toegepast op vele laboratoria. Apparatuur is in grote verscheidenheid beschikbaar. Een kritische stap in het geheel is de introductie van het vluchtige extract in het AAS-instrument. Nader onderzoek en een eenduidige procedure hiervoor is wenselijk om deze methode op grotere schaal toe te passen.

Indicatie van looptijd (inclusief extractie-procedure) en analysekosten per bepaling:

methode	looptijd (min)	analysekosten (fl)
OSn/AAS	60	200

NB. Zie de opmerkingen bij de tabel voor de organohalogeënbepalingen (bijlage 5).



## ORGANISCHE MICROVERONTREINIGINGEN (HPLC/UV-FINGERPRINTS)

### 1. Principe

Met behulp van een niet-specifieke extractie worden organische verbindingen uit water geëxtraheerd, waarna deze verbindingen met HPLC gescheiden worden en als afzonderlijke componenten met UV-detectie worden gemeten.

Door de extractie uit te voeren als vaste fase extractie (SPE) on-line gekoppeld aan het HPLC-instrument wordt hiermee een zeer breed scala aan organische verbindingen geëxtraheerd, variërend van apolair tot polair. Deze laatste categorie is nog met vrijwel geen andere isolatietechniek goed te extraheren.

Door een watermonster onder gestandaardiseerde condities (type adsorbens, volume adsorbens, voorbehandeling adsorbens, volume water, pH, evt. ionsterkte) te concentreren op een vaste fase, en de geadsorbeerde componenten eveneens onder gestandaardiseerde condities te elueren en te scheiden op een analytische HPLC-kolom (eluens-samenstelling, gradiënt, kolom (fase, lengte, diameter, deeltjesgrootte)) en te detecteren met een UV-detector (bij bijv. 245 nm) wordt een HPLC-chromatogram verkregen van alle geconcentreerde en UV-absorberende stoffen. Dit betreft dan zowel individuele verbindingen (zichtbaar als een piek in het chromatogram) als de "humeuze" verbindingen (zichtbaar als een bult in het chromatogram). Een chromatogram als figuur 7.1 is de resultante.

### Betekenis van de resultaten van de metingen

Kiwa past deze fingerprint gedurende enkele jaren incidenteel toe in haar onderzoek, en komt daarbij tot de volgende bevindingen:

- de bult is representatief voor het natuurlijke organische materiaal in het monster. In oppervlaktewater is het oppervlak van de bult een factor hoger dan de som van de piekoppervlakken. Het oppervlak van de bult van onder zure condities geconcentreerd water correleert zeer significant met het DOC-gehalte.
- anthropogene verontreinigingen worden zichtbaar als pieken in het chromatogram. Een kanttekening is dat niet alle pieken perse antropogeen zijn. Wel is het zo dat de mate van verontreiniging correleert met het aantal pieken. Duidelijk is dit te zien in figuur 7.2, waar drie chromatogrammen gegeven zijn van pH=7 concentraten van: a. ruw oppervlaktewater; b. voorgereinigd oppervlaktewater; c. drinkwater bereid uit het oppervlaktewater.
- Door de toevoeging van TEA (triethylamine) aan het eluens wordt een goede HPLC-scheiding verkregen met scherpe, symmetrische pieken en reproduceerbare retentietijden. De informatie over hydrofobiciteit gaat hiermee echter verloren vanwege de ionpaarvorming met anionogene componenten. Zonder TEA wordt wel een verdeling van de hydrofobiciteit verkregen, echter ten koste van de chromatografische prestaties (piekvorm).
- Op basis van de Kiwa-onderzoek waarbij de XAD-isolatie, fractionering, Ames-mutageniteitstesten en GC/MS-analyses gecombineerd zijn met een toxicologische evaluatie van de geïdentificeerde verbindingen en HPLC/UV-fingerprints, worden de volgende conclusies getrokken:
  - de mutageniteit zit met name in de niet-gaschromatografeerbare fractie, nl. de fractie met meer hydrofiele verbindingen.

## Bijlage 7

- in de gaschromatografeerbare fractie worden wel toxicologisch relevante stoffen aangetroffen.
- het is dan ook te verwachten dat in de polaire fractie meer of sterker toxische/mutagene verbindingen aanwezig zullen zijn
- deze polaire fractie, die verbindingen bevat die wel met XAD geïsoleerd worden, kan wel met HPLC geanalyseerd worden
- voornamelijk is HPLC/MS niet in staat om onbekende verbindingen te identificeren op een manier zoals GC/MS dat kan. Dit betekent dat het toekennen van namen en daaraan gekoppeld een toxicologische evaluatie momenteel nog niet mogelijk is voor deze polaire fractie. Met de in ontwikkeling zijnde interfaces en de ontwikkeling van HPLC/MS-kennis en HPLC/MS spectrum-bibliotheken is het de verwachting dat over 5-10 jaar dit wel mogelijk zal zijn.

Op basis hiervan kan gesteld worden dat met de HPLC/UV-fingerprint organische stoffen zichtbaar gemaakt zullen worden die uit het oogpunt van waterkwaliteit zeer relevant zijn, zonder dat het nu al mogelijk is daar stof-namen aan toe te kennen. Als waterkwaliteits-parameter kan gekozen worden voor het aantal discrete pieken dat een bepaalde drempelwaarde overschrijdt, dan wel het totale oppervlak van deze pieken, dan wel beide.

Aanvullend hierop biedt deze techniek op 4 niveaus mogelijkheden om een beeld te krijgen van de waterkwaliteit (zie punt 5, Aanvullende methoden). Voor meer informatie wordt verwezen naar de volgende referenties: [Noij en Brandt, 1995; Noordsij, 1995; Hoogendoorn en van Zoonen, 1995; Pichon and Hennion, 1994; Slobodnik et al. 1993; ISO, 1995; Adriaanse et al., 1995; van Loon en Hermens, 1995].

### **2. Verbindingen waar de methode betrekking op heeft**

Met deze methode worden alle apolaire tot polaire verbindingen gemeten (die met een a-specifiek adsorbens als het polymeer "PLRP-s" geëxtraheerd worden) die bij de geselecteerde golflengte (in de range 230-260 nm) UV-adsorptie vertonen. Door gebruik te maken van HPLC als scheidingstechniek kan een onderscheid gemaakt worden tussen natuurlijke "humeuze" stoffen en "(waarschijnlijk) antropogene" stoffen. Met de HPLC/UV-fingerprint wordt het grootste gedeelte van de verontreinigingen zichtbaar gemaakt zoals die voorkomen in wettelijke regelingen, zoals de Wet Milieugevaarlijke Stoffen, 3e Nota Waterhuishouding, Milbowa, en andere (europese) normen op dit gebied. In de onderstaande tabel wordt een (beperkt) aantal kenmerkende groepen genoemd:

methode	doelstoffen
HPLC/UV-fingerprint	apolaire tot polaire anthropogene organische microverontreinigingen met UV-absorptie, waaronder: <ul style="list-style-type: none"> <li>- bestrijdingsmiddelen (schatting: meer dan 90% van de toegelaten middelen)</li> <li>- PAK en andere aromatische koolwaterstoffen</li> <li>- gesubstitueerde aromaten: gehalogeneerde aromaten, nitro-aromaten, etc.</li> <li>- fenolen en anilines (chloor-, nitro-, etc.)</li> <li>- ftalaten</li> <li>- voorts grote delen van de groepen die ook met EOX, XOX en AOX worden gemeten</li> <li>- idem voor de totaalbepalingen organostikstof (ON), organofosfor (OP) en organozwavel (OS)</li> </ul>

### 3. Gevoeligheid en performance

De gevoeligheid en performance van de methode hangt sterk af van de component (zowel de plaats in het chromatogram en de UV-extinctie) als ook van de beïnvloeding door andere componenten en het in bewerking genomen volume water. Hoewel de HPLC/UV-fingerprint methode nog niet als zodanig gestandaardiseerd is (dit zou eventueel het resultaat van een vervolgfase kunnen zijn), zijn er in de literatuur al wel een groot aantal analysemethoden beschreven die gebruik maken van de techniek van SPE en HPLC. Ook in het verband van normalisatie activiteiten (NEN, ISO, CEN) zijn deze methoden in opkomst. Deze methoden richten zich vaak op bestrijdingsmiddelen, waarvoor aantoonbaarheidsgrenzen tussen 0,03 en 1  $\mu\text{g/l}$  worden gerapporteerd. Onderstaande tabel geeft een voorbeeld van een aantal doelstoffen (bestrijdingsmiddelen) met de daarbij horende prestatie-kenmerken zoals in de literatuurreferenties zijn vastgesteld.

doelstof	det.lim [ $\mu\text{g/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
atrazin	0,03	>3	10
diuron	0,03	>3	10
bentazon	0,04	>3	15
2-nitrofenol	1	>3	12
carbendazim	0,1	>3	15

### 4. Indicatie toegankelijkheid

Apparatuur is op grote schaal commercieel verkrijgbaar en is op de meeste (water- en milieu-) laboratoria in de configuratie HPLC met UV-detectie aanwezig. Hetzelfde geldt voor de benodigde apparatuur voor data-verwerking.

Zowel vaste fase extractie als HPLC-analyse zijn voldoende uitontwikkeld en worden op grote schaal routinematig toegepast. On-line technieken zijn de laatste jaren sterk in opmars en zijn als geïntegreerd systeem commercieel beschikbaar dan wel zeer eenvoudig zelf samen te stellen op basis van afzonderlijke componenten.



## Bijlage 7

Toepassing van de techniek als HPLC/UV-fingerprint vindt (nog) niet op grote schaal plaats. Nader onderzoek is hiervoor nodig om de betekenis ervan beter te kunnen vaststellen en definiëren, en ook om een betekenisvolle kwantitatieve kwaliteitsparameter te definiëren. Bij gebleken geschiktheid zou dit moeten leiden tot een gestandaardiseerde meetmethode die voor normalisatie in NNI- en/of ISO/CEN-kaders wordt vormgegeven.

Indicatie van looptijd (inclusief extractie-procedure) en analysekosten per bepaling:

methode	looptijd (min)	analysekosten (fl)
HPLC/UV-fingerprint	90	200-400

NB. Zie de opmerkingen bij de tabel voor de organohalogeënbepalingen (bijlage 5).

### 5. Aanvullende methoden

De HPLC-fingerprint als somparameter biedt de mogelijkheid om deze techniek op 4 hogere niveaus toe te passen, waardoor een aanvullend en meer gedetailleerd beeld van de waterkwaliteit wordt verkregen:

#### niveau 1 (de voorgestelde somparameter)

Een HPLC/UV chromatogram waarbij het aantal discrete pieken (die qua grootte een bepaalde drempelwaarde overschrijden) geteld wordt, dan wel het totale oppervlak van deze pieken, dan wel beide. Het aantal c.q. oppervlak is een maat c.q. indicatie voor de verontreiniging.

#### niveau 2

Door van een aantal doelstoffen (bijvoorbeeld de in wettelijke richtlijnen genoemde stoffen) de retentietijden en responsie vast te leggen, kunnen pieken uit het chromatogram in verband gebracht worden met de mogelijke aanwezigheid en concentratie van deze doelstoffen.

#### niveau 3

Door in plaats van een UV-detector gebruik te maken van een diode array detector kan door het vergelijken van de UV-spectra van pieken uit het HPLC-chromatogram en bibliotheek-spectra de zekerheid omtrent de aanwezigheid van de doelstoffen vergroot worden. Er kan dan gesproken worden over waarschijnlijke aanwezigheid en concentratie.

#### niveau 4

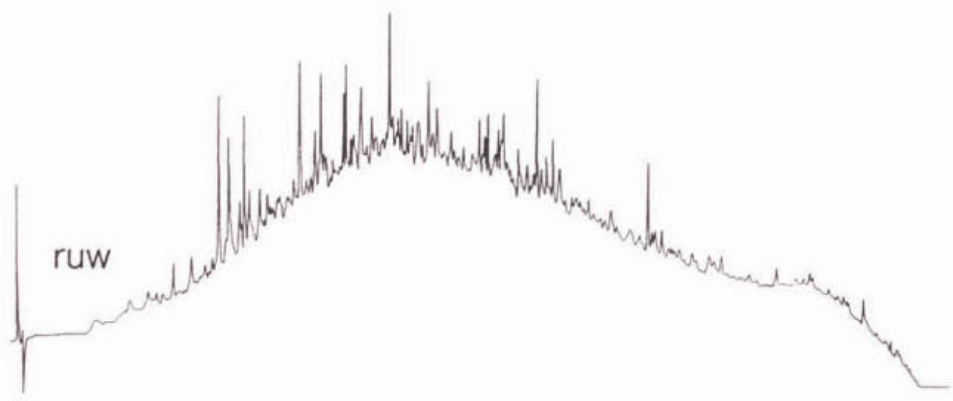
Door de detectie uit te voeren met een massaspectrometer (MS of MS/MS) kan de aanwezigheid van doelstoffen zekergesteld worden. Er is dan sprake van de zekere aanwezigheid en concentratie.

#### niveau 5

Identificatie van onbekende verbindingen die in het HPLC/UV chromatogram voorkomen, waarbij van HPLC/MS(/MS) gebruik gemaakt wordt.

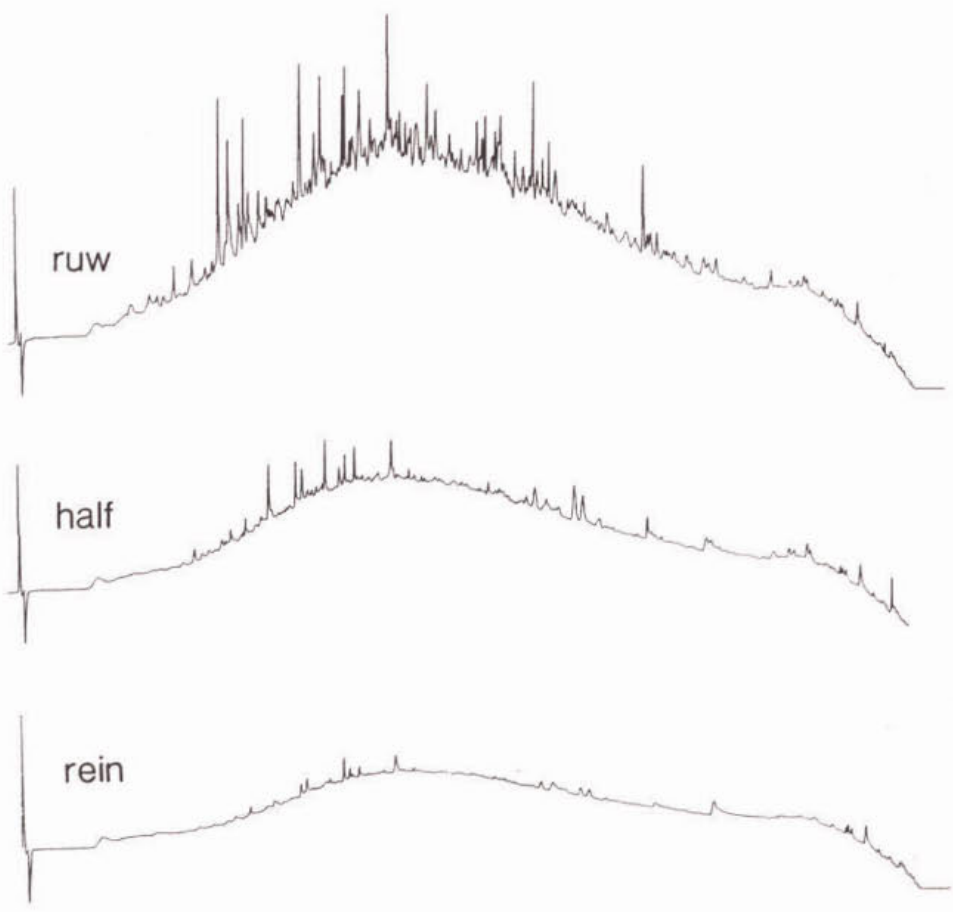
Figuur 7.1

HPLC/UV pH7 OUDDORP



Figuur 7.2

HPLC/UV pH7 OUDDORP





## ELEMENT-SPECIFIEKE ORGANISCHE MICROVERONTREINIGINGEN (GC/AED-FINGERPRINTS)

### 1. Principe

Met behulp van een niet-specifieke extractie worden organische verbindingen uit water geëxtraheerd, waarna met behulp van GC/AED element-specifiek het totaalgehalte aan hetero-element verbindingen wordt vastgesteld.

De meting geschiedt door een extract te analyseren met gaschromatografie (GC) waarbij de afzonderlijke componenten gescheiden worden, en vervolgens deze te detecteren met een Atomaire Emissie Detector (AED), waarbij de componenten geatomiseerd worden en in een argon-plasma atomaire emissie optreedt. Door meting van de emissie bij specifieke golflengtes, worden de afzonderlijke elementen gemeten. Feitelijk is de meting van elk element een aparte methode. Aangezien de gebruikte techniek en apparatuur gelijk zijn, en bovendien enkele elementen gelijktijdig gemeten kunnen worden, wordt de GC/AED-fingerprint hier als één methode beschreven.

Door per spoor (golflengte) de piekoppervlakten te sommeren wordt een totale hoeveelheid van het betreffende element gemeten in het gaschromatografeerbare, organische materiaal. Aangezien een verontreiniging met organische stoffen zich in het algemeen zal uiten in een toename van het gaschromatografeerbare materiaal, wordt met de GC/AED-fingerprint een indicatie van de verontreinigingsgraad verkregen.

Afhankelijk van de gekozen golflengte van de AED wordt specifiek één element gemeten, waarbij met name de sporen voor chloor (OCl), broom (OBr), stikstof (ON), fosfor (OP), zwavel (OS) en tin (OSn) van belang zijn.

De aard van de gemeten stoffen wordt mede bepaald door de gekozen extractie-procedure (type organisch oplosmiddel bij vloeistof-extractie en type adsorbens bij vaste fase extractie). In alle gevallen gaat het om relatief apolaire en vluchtige verbindingen die met een gaschromatograaf analyseerbaar zijn (HPLC/AED is (nog) niet operationeel).

Voor meer informatie wordt verwezen naar de volgende referenties: [Uden, 1995; Wylie and Quimby, 1989; Flentge, 1995; AWWA/Kiwa, 1988; Noij et al., 1989a; Noij et al., 1989b; NEN, 1991a; NEN, 1991b; ISO, 1989b; Adriaanse et al., 1995; van Loon en Hermens, 1995; Noij, en Brandt, 1995; Noordsij, 1995; Hoogendoorn en van Zoonen, 1995; Pichon and Hennion, 1994; Slobodnik et al. 1993; ISO, 1995].

### 2. Verbindingen waar de methode betrekking op heeft

De methode meet alle gaschromatografeerbare verbindingen die het betreffende element in hun structuur hebben en met de voorbereiding geëxtraheerd zijn.

In de volgende tabel worden per element enkele kenmerkende (groepen van) stoffen genoemd.

## Bijlage 8

methode	doelstoffen
OCI	apolaire tot matig polaire organochloorverbindingen, zoals: gechloreerde aromaten, organochloor bestrijdingsmiddelen, chlooranilines, gechloreerde oplosmiddelen
OB <sub>r</sub>	apolaire tot matig polaire organobroomverbindingen, zoals: organobroom bijprodukten van chloring en oxidatie (dibroomacetonitril, bromoform), organobroom bestrijdingsmiddelen (bromacil, bromophos)
ON	apolaire tot matig polaire organostikstofverbindingen, zoals veel bestrijdingsmiddelen, anilines, nitro-aromaten
OP	apolaire tot matig polaire organofosforverbindingen, zoals bestrijdingsmiddelen, alkylfosfaten
OS	apolaire tot matig polaire organozwavelverbindingen, zoals bestrijdingsmiddelen, thiolen, benzeensulfonamides
OS <sub>n</sub>	organotin-bestrijdingsmiddelen (alkyl- en phenyl-tin verbindingen)

### 3. Gevoeligheid en performance

De gevoeligheid van de methode is sterk afhankelijk van het te meten element. Zo wordt een hoge gevoeligheid verkregen voor bijvoorbeeld zwavel-, fosfor- en tin-verbindingen, maar is de gevoeligheid voor chloor- en stikstofverbindingen beperkt. Behalve de absolute gevoeligheid speelt bij de performance ook de selectiviteit een rol, die bij de AED erg hoog is. Dit betekent dat storing door componenten die niet het betreffende hetero-atoom bezitten zeer gering is (selectiviteit ten opzichte van koolstof is in de range van 1000 tot 100.000).

Onderstaande tabel geeft een overzicht van de prestatie-kenmerken voor de verschillende elementen.

methode	det.lim [ $\mu\text{g/l}$ ]	lin.bereik (decaden)	st.dev bij 10x det.lim (%)
OCI	0,4	>4	10
OB <sub>r</sub>	0,1	>3	10
ON	0,08	>4	10
OP	0,01	3	10
OS	0,02	>4	10
OS <sub>n</sub>	0,01	>3	10

### 4. Indicatie toegankelijkheid

Gaschromatografische apparatuur is op grote schaal verkrijgbaar, Atomaire Emissie detectoren echter niet. Het enige commercieel verkrijgbare instrument is van Hewlett Packard. Met AED-detectie bestaat, vooral in het onderzoek naar waterkwaliteit, nog erg weinig ervaring. Het instrument wordt voor zover bekend niet routinematig toegepast.

## Bijlage 8

Afhankelijk van de emissie-golflengte kunnen verschillende elementen gelijktijdig (dat wil zeggen in één analysegang) gemeten worden: ON, OP en OS bij 174-182 nm, OCl en OBr bij 470-480 nm.

Indicatie van looptijd (inclusief extractie-procedure) en analysekosten per analysegang:

methode	looptijd (min)	analysekosten (fl)
OCl en OBr	180	500
ON, OP en OS	180	500
OSn	180	500

NB. Zie de opmerkingen bij de tabel voor de organohalogeerbepalingen (bijlage 5).



## DETECTIE VAN ORGANOFOSFORBESTRIJDINGSMIDDELEN IN OPPERVLAKTEWATER MET BEHULP VAN ACUTE TOXICITEITSTESTEN MET KREEFTACHTIGEN

### 1. Inleiding

Bekend is dat kreeftachtigen zeer gevoelig zijn voor organofosforbestrijdingsmiddelen (zie bijlage 1). Met name voor de acute toxiciteitstest met de watervlo *Daphnia magna* zijn veel gegevens beschikbaar die dit aan tonen. Een nadeel van deze test is echter dat de watervlooiën moeten worden betrokken uit een gestandaardiseerde kweek. Op dit moment is de Thamnotokit F, die gebruik maakt van de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus*, een mogelijk alternatief. In deze zogenaamde Toxkit worden de testorganismen door ontluiking verkregen uit gedroogde cysten, die in de kit worden bijgeleverd. De cysten kunnen minimaal een half jaar worden bewaard, zodat een kweek overbodig is en dus veel kosten-effectiever kan worden gewerkt.

### 2. Bekende gegevens

Voor elk van de hier beschreven testen (ISO 6341 *Daphnia magna* test, *Daphnia magna* Fluo-test (zie *Daphnia magna* IQ-test), Thamnotokit F. en Thamnotokit Fluo-test) werd in bijlage 1 het testprincipe reeds beschreven.

Aanvullende op de in bijlage 1 opgenomen informatie, konden voor beide testorganismen (*Daphnia magna* en *Thamnocephalus platyurus*) criteria (randvoorwaarden) geïnventariseerd worden. Het gaat hier om criteria voor de zogenaamde "modifying factors" zoals zuurgraad, zuurstofgehalte, hardheid etc. Deze criteria zijn weergegeven in tabel 9.1.

Tabel 9.1 Randvoorwaarden

parameter	géén negatieve effecten te verwachten bij:	
	<i>Daphnia magna</i> (module I)	<i>Thamnocephalus platyurus</i> (module II)
pH	> 5 en < 9	> 5 en < 11
O <sub>2</sub> (mg/l)	> 2	> 2
hardheid (mg/l als CaCO <sub>3</sub> )	< 1500	
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (mg/l)	< 14.6	< 1.6
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (mg/l)	< 75	< 3.3
NH <sub>3</sub> (mg/l)	< 3.8	
Cl <sup>-</sup> (g/l)	< 1.8	< 0.6
geleidbaarheid (mS/m)	< 750	

Bovendien werden voor *Daphnia magna* aanvullende toxiciteitsdata geïnventariseerd; voor organofosforbestrijdingsmiddelen die voorkomen op de I-lijst (Evaluatienota Water). Hierbij is onder andere op basis van CAS nr. gezocht in het in het bestand AQUIRE van het database systeem DATATOXr. De resultaten van deze aanvullende inventarisatie zijn weergegeven in tabel 9.2. In deze



## Bijlage 9

tabel zijn de laagste gevonden EC50-waarden vermeld voor een blootstellingsduur van 24 en 48 uur. Tevens is in de kolom "concentratiefactor tot ENW" aangegeven hoeveel maal een watermonster geconcentreerd zou moeten worden om een stofconcentratie op grenswaarde-niveau op te hogen tot deze laagste EC50(24 of 48 uur)-waarde. Na concentrering is het dan theoretisch mogelijk om toxiciteit (50% effect) op grenswaarde-niveau te detecteren. Gemiddeld moet voor alle bestrijdingsmiddelen samen 43 maal geconcentreerd worden om dit grenswaarde-niveau te kunnen detecteren.

Tabel 9.2 Data voor organofosforbestrijdingsmiddelen (concentraties in  $\mu\text{g/l}$ )

Analiët	M/l-lijst [ENW, 198	ENW grens- waarde	Daphnia 24 uur EC50	Daphnia 48 uur EC50	laagste concentratie waarde EC50	concentratie factor tot ENW	Rijnland MAX
Azinfos-ethyl	I	0.05		3.2	3.2	64	5.05
Azinfos-methyl	I	0.02	0.18	1.6	0.18	9	
Cumafos	I	0.002	0.1		0.1	50	
Demeton(-S-methyl)	I	0.4					
Diazinon	I	0.03		0.7	0.7	23	
Dichloorvos	I	0.002	20	0.07	0.07	35	2.3
Disulfoton	I	1.5	0.4		0.4	0.3	
Fenitrothion	I	0.05	8.4	11	8.4	168	
Fention	I	0.02		0.8	0.8	40	
Foxim	I	0.2					
Malathion	I	0.004	0.098	1	0.098	25	0.4
Mevinfos	I	0.005		0.18	0.18	36	0.02
Oxydemethon-methyl	I	0.1					
Parathion	I	0.005	0.8	0.2	0.2	40	0.5
Parathion-methyl	I	0.2	4.8	0.14	0.14	1	
Permethrin			0.2	0.2	0.2		
Propethamfos							
Pyrazofos	I	0.003					
Triazofos	I	0.03		3	3	100	
Trichloorfon	I	0.005	0.12	0.08	0.08	16	
Thiomethon							

Voor de kreeftachtige *Thamnocephalus platyurus* zijn nauwelijks of geen toxiciteitsdata beschikbaar voor organofosforbestrijdingsmiddelen. Op basis van 146 waarnemingen (toxiciteitsdata voor zuivere stoffen, effluenten, sedimentmonsters etc.) is in een vergelijkende studie een bijna 1 op 1 relatie (significant) gevonden voor de gevoeligheid van de acute *Daphnia magna*-test (24 uur) en de *Thamnotoxkit* F-test [Persoone et al., submitted]. De verwachting is dan ook dat de gevoeligheid van *Thamnocephalus platyurus* voor organofosfor-bestrijdingsmiddelen vergelijkbaar is met *Daphnia magna*.

Voor verder validatie-onderzoek wordt voorgesteld om gebruik te maken van Dichloorvos en Parathion als modelstoffen. Beide zijn bekende probleemstoffen. De keuze voor deze stoffen is mede gebaseerd op het verschil in stoffeigenschappen: Dichloorvos is goed in wateroplosbaar en vluchtig terwijl Parathion matig oplosbaar en enigszins vluchtig is (zie tabel 9.3).

Tabel 9.3 Aanvullende data voor enige organofosforbestrijdingsmiddelen

Analiëet	vluchtigheid	klassificering	wateroplosbaarheid mg/l (bij 20°C)	log Kow	afbreekbaarheid (DT50)
Azinfos-ethyl	-	-	-	-	-
Azinfos-methyl	matig	matig	30	-	ca. 3 weken
Dichloorvos	vluchtig	goed	10000	-	<1 dag
Malathion	enigszins	matig	145	2,89	-
Parathion	enigszins	matig	24	3,81	ca. 2 tot 7 dagen

Tot slot werden de mogelijkheden van een preconcentrerings voor het verbeteren van de gevoeligheid van de testen geïventariseerd. Een aantal technieken, waarmee oppervlaktewater kan worden geconcentreerd werden al in hoofdstuk 4 besproken. Voor het concentreren van organofosforbestrijdingsmiddelen lijkt het toepassen van een vaste fase extractie (SPE: Solid Phase Extraction) met behulp van ISOLUTer ENV+ kolommen veelbelovend. Als 'sorbent' wordt in deze kolommen gebruik gemaakt van polymeren op basis van polystyreen. Dit materiaal is na een bepaalde voorbehandeling zeer geschikt om de meer polaire analieten uit water te binden. Als zodanig is deze techniek volgens opgave van de fabrikant en een toelichting van de leverancier Sopachem (dhr. Pijpers) zeer geschikt voor het concentreren van organofosforbestrijdingsmiddelen.

### 3. Onvoldoende bekende aspecten

#### Reële gevoeligheid toxiciteitstesten

Wanneer voor *Daphnia magna* de resultaten van verschillende studies naast elkaar worden gelegd, dan kunnen voor één stof, bij dezelfde blootstellingsduur, de hoogste en de laagste gevonden EC50-waarden met een factor 100 of meer van elkaar verschillen. Daarnaast is niet altijd duidelijk of de EC50-waarden zijn gebaseerd op nominale of daadwerkelijk geanalyseerde concentraties. Voor de *D. magna* IQ-, de Thamnotoxkit F- en de Thamnotoxkit Fluo-test konden voor de 4 genoemde probleemstoffen (zie tabel 9.2) geen EC50-waarden worden gevonden. Het is dus noodzakelijk om de gevoeligheid van de testen exact in beeld te brengen.

Vrijwel alle gevonden EC50-waarden zijn gebaseerd op het testen van de betreffende stof opgelost in een gestandaardiseerd watermedium. Het medium waarin een te testen stof is opgelost wordt de matrix genoemd. Algemeen is bekend dat samenstelling van de matrix een invloed heeft op de toxiciteit van een stof. Wanneer bijvoorbeeld organische stof aanwezig is kunnen toxicanten hieraan worden gebonden, waardoor ze niet meer (biologisch) beschikbaar zijn voor opname door de testorganismen. De toxiciteit zal in dat geval lager zijn dan op basis van de (chemisch geanalyseerde) concentratie wordt verwacht. Met name voor milieumonsters (zoals oppervlaktewater) speelt dit een rol. Bovendien is van deze monsters vaak niet, of niet voldoende bekend wat de exacte samenstelling van de matrix is. Het is dus eveneens noodzakelijk om enig inzicht te krijgen in de gevoeligheid van de testen wanneer (schoon) oppervlaktewater als matrix wordt genomen.

## Bijlage 9

### Verhoging performance "standaard" toxiciteitstesten

Bij de bepaling van een EC50-waarde wordt gekeken naar de concentratie toxicant die 50% effect geeft. Om een onderscheid te kunnen maken tussen verdachte en niet verdachte watermonsters is het echter voldoende om aan te tonen dat blootstelling aan een bepaalde concentratie toxicant resulteert in een significant negatief effect. Afhankelijk van het aantal replica's, het aantal testdieren per replica, de mate van effect in de controletest en de gehanteerde statistische toets, is het meestal mogelijk om significant effect van minder dan 50% aan te tonen (b.v. significant effect bij 5 of 10% sterfte). De gevoeligheid van de test (= detectielimiet toxiciteitstest) zal daardoor verbeteren. Omdat in standaard toxiciteitstesten wordt gekeken naar de EC50-waarden zijn veelal geen criteria bekend voor het aantonen van een significant effect van b.v. 5% immobiliteit. Voor vervolgonderzoek zal het derhalve noodzakelijk zijn om statistische power-berekeningen uit te voeren om te bepalen hoe de proefopzet moet zijn om dit te kunnen aantonen.

Een verlenging van de blootstellingsduur kan in theorie ook leiden tot een verbetering van de gevoeligheid. Verlengen van de testduur tot 48 uur (oorspronkelijk 24 uur voor de immobiliteitstesten en ca. 1 uur voor de fluorescentietesten) kan derhalve een positief effect op de gevoeligheid hebben. Hierbij dient nog opgemerkt te worden dat de gevoeligheid van sub-lethaliteitstesten (bijvoorbeeld de remming van enzymen in de fluorescentie testen) naar alle waarschijnlijkheid al beter is dan de gevoeligheid van testen waarbij parameter sterfte (immobiliteit) bepaald wordt.

Verder is er nog maar weinig ervaring opgedaan met het gebruik van ENV+ kolommen voor het concentreren van organofosforbestrijdingsmiddelen in combinatie met de hierboven beschreven testen. Op basis van besprekingen met enkele deskundigen op het gebied van concentreringstechnieken (o.a. de heer J. Struijs; milieuchemicus RIVM, de heer Pijpers; produktdeskundige Sopachem en mevrouw Kooi; KIWA) lijkt het echter zeker de moeite waard om deze "nieuwe" techniek uit te proberen.

Een algemeen probleem bij het testen van concentraten met behulp van organismen bestaat in het feit dat het eluaat waarmee de stoffen weer van de vaste fase worden 'losgemaakt' zelf ook toxisch zijn. Het eluaat zal derhalve moeten worden afgeblazen en vervangen worden door standaard zoetwatermedium. Daarbij moet rekening gehouden worden met het mogelijk vervluchtigen van de organofosforbestrijdingsmiddelen

#### **4. Kosten en tijdsaspecten**

Hieronder worden de materiaal kosten aangegeven voor het uitvoeren van 1 test (5 concentraties en 1 controlemonster; 20-30 organismen per concentratie) met de twee typen testorganismen:

Daphnia magna + medium	Fl. 500,- à 600,-
Thamnocephalus (complete testkit)	Fl. 50,-

Bovendien is recentelijk nog een complete testkit op basis van Daphnia magna op de markt gekomen. De test bevat voldoende organismen en materiaal voor het uitvoeren van 6 testen (5 concentraties en 1 controlemonster; 20-30 organismen per concentratie). De prijs van deze testkit bedraagt Fl. 500,- à Fl. 550,-.

Tijdsaspecten kwamen hierboven al aan de orde.

## DETECTIE VAN HERBICIDEN EN CYCLODIËNEN IN OPPERVLAKTEWATER MET BEHULP VAN IMMUNOASSAYS

### Fenylureumherbiciden (groepspecifieke immunoassay)

#### 1. Inleiding

Immunoassay voor de detectie van de groep van de fenylureumherbiciden (standaard chloortoluron) in water. Deze assay is een competitieve ELISA = Enzym Linked Immuno Sorbent Assay. De standaard van de kit is chloortoluron.

Het antilichaam is gecoat op de wanden van de putjes van de microtiterplaat. Voor de meting wordt een bepaalde hoeveelheid chloortoluron-enzymconjugaat toegevoegd tegelijkertijd met bekende hoeveelheden chloortoluron als standaard of een onbekende hoeveelheid in een te meten monster. Geconjugeerde en ongeconjugeerde chloortoluron zullen een competitie aangaan voor bindingsplaatsen op het antilichaam. Hoe meer chloortoluron in de standaard of het monster, des te minder enzymconjugaat aan het antilichaam kan binden. Na incubatie worden alle ongebonden stoffen gewassen. Daarna worden chromogeen en enzymsubstraat toegevoegd. Hoe minder enzym gebonden is aan het antilichaam, des te lager de omzetting van het chromogeen en als gevolg des te minder kleur ontstaat. De concentratie chloortoluron (of verwante verbinding) in het monster is derhalve omgekeerd evenredig aan de kleur in het betreffende putje.

#### 2. Bekende gegevens

De detectielimiet voor de standaard (chloortoluron) alleen is volgens de kitbijsluiters 0,04  $\mu\text{g/l}$ . Het meetbereik voor chloortoluron is 0,04-2,0  $\mu\text{g/l}$ . De kit is echter ontworpen als groepspecifiek. Dat wil zeggen, het antilichaam waarmee de strips bekleed zijn, vertoont een kruisreactiviteit voor meerdere andere verbindingen uit de groep van de fenylureumherbiciden. In een evaluatie-onderzoek met monsters, waaraan 10 verschillende verbindingen geaddedeerd waren, bleek de som van de gemeten verbindingen ongeveer evenredig hoger. Voor een concentratie van 0,2  $\mu\text{l}$  van elke verbinding werd een somconcentratie van ongeveer 2  $\mu\text{g/l}$  gevonden.

De door de fabrikant opgegeven kruisreactiviteiten zijn in de tabel hieronder weergegeven. Opgemerkt moet worden dat de detectielimiet (d.l.) de concentratie voor de betreffende verbinding bij 90% B/B0 is. Het percentage kruisreactiviteit wordt berekend aan de hand van de concentraties bij 50% B/B0, waarbij de kruisreactiviteit voor chloortoluron op 100% wordt gesteld.

## Bijlage 10

<u>Verbinding</u>	<u>d.l.</u>	<u>50% B/B0</u>	<u>Kruisreactiviteit</u>
Diuron	0,02	0,29	183
chlooranocryl	0,023	0,73	73
chloortoluron	0,04	0,53	100
neburon	0,027	0,21	252
linuron	0,02	0,48	110
chloorbromuron	0,030	0,71	75
monolinuron	0,037	4,5	12
metobromuron	0,056	4,8	11
monuron	0,07	2,3	23
metoxuron	0,49	20	3
propanil	0,55	18	3
fluometuron	0,70	11	3
isoproturon	5,9	130	< 1
siduron	8,6	310	< 1
fenuron	11	120	< 1
propyzamide	25	330	< 1
alachloor	59	2100	< 1
chloormethiuron	120	1200	< 1
methabenzthiazuron	130	1300	< 1
chlooroxuron	130	1600	< 1

NB: d.l. is de detectielimiet berekend op 90% B/B0; d.l. en 50% B/B0 waarden zijn gegeven in  $\mu\text{g/l}$ ; de kruisreactiviteit is gegeven in %.

De precisie van de kit werd in het evaluatie-onderzoek eveneens reeds bepaald aan de hand van een serie gefiltreerde controlemonsters: Lekkanaalwater met 0,05 en 0,2  $\mu\text{g/l}$  van 10 verschillende verbinding gaf een inter-assay variatiecoëfficiënt van respectievelijk 20,5 en 16,5%; drinkwater met dezelfde 10 verbindingen gaf een inter-assay variatiecoëfficiënt van respectievelijk 20,4 en 15,7%. De intra-assay variatiecoëfficiënt was 15,9% ( $n = 5$ ) in ongefiltreerd Waalwater.

### 3. Onvoldoende bekende aspecten

Een immunoassay kan beïnvloed worden door de pH van het monster, de aanwezigheid van organische oplosmiddelen en matrixeffecten (bijv. vaste deeltjes en humuszuren). Omdat het erop lijkt dat de fenylureumkit beïnvloed wordt door vaste deeltjes in het monster, zal uitgezocht moeten worden of een voorbehandeling zoals filtratie nodig is.

De recovery/kruisreactiviteit is voor een groepspecifieke immunoassay moeilijk te bepalen. Enige informatie kan verkregen worden aan de hand van geaddeerde watermonsters, waarvan met een referentiemethode de concentraties van de diverse verbindingen bepaald zijn. Over de lineariteit zijn tot nu geen gegevens bekend. Wat betreft de precisie zijn de inter-assay en intra-assay variatiecoëfficiënten in beperkte mate bepaald.

Tot slot kan drift, als gevolg van verschillen in reactietijd binnen een serie metingen, nog een rol spelen. Het is gebleken, dat de fenylureumkit, wanneer hij in 2 delen wordt gebruikt, weinig drift vertoont.

#### 4. Kosten en tijdsaspecten

Bij gebruik van een volle microtiterplaat (8 strips) zijn 96 putjes beschikbaar. Naast de standaarden kunnen dan 28 watermonsters in triplo gemeten worden. Bij een lager monsteraanbod kan de kit ook 2 of meer keren gebruikt worden, waarbij echter het totale aantal monsters relatief minder wordt omdat elke keer de standaarden meegenomen moeten worden. Een assay neemt inclusief berekening in totaal ongeveer 4 uur in beslag.

De kosten van een fenylureumherbicidenkit (Millipore) bedragen 1075,00 (excl. BTW). Verder zal over het algemeen een eenmalige kapitaalinvestering voor een microtiterplaatreaders noodzakelijk zijn (verkrijgbaar bij diverse leveranciers in verschillende prijsklassen vanaf ongeveer Fl. 6.000,00 (Microtiterplaat Stripreader van Millipore))

### Triazines (groepspecifieke immunoassay)

#### 1. Inleiding

Immunoassay ontworpen voor de detectie van atrazine, maar door de kruisreactiviteiten specifiek voor meerdere triazineverbindingen. De assay is een competitieve ELISA, waarbij het antilichaam is gecoat op magnetiseerbare deeltjes. Evenals in voor de fenylureumherbicidenassay is de reactie een competitieve bindingsreactie tussen atrazine-enzym-conjugaat en atrazine (en/of verwante triazines) in de standaardoplossingen of de monsters. Na incubatie worden de ongebonden stoffen verwijderd door de aan de deeltjes gebonden fractie neer te slaan met behulp van een sterke magneet en de bovenstaande vloeistof te verwijderen. Op de gebonden fractie wordt een enzymkleur-reactie uitgevoerd. Ook nu weer is de concentratie atrazine/triazines in het monster omgekeerd evenredig met de ontwikkelde kleur.

#### 2. Bekende gegevens

De atrazinekit is in een praktijkonderzoek geëvalueerd. Volgens de bijsluiters heeft de kit voor atrazine volgens de bijsluiters een detectielimiet van 0,046  $\mu\text{g/l}$  bepaald bij 90% B/B0 en een lineair meetbereik van 0,05-5,0  $\mu\text{g/l}$ . Het is gebleken, dat deze detectielimiet verlaagd kan worden tot 0,02  $\mu\text{g/l}$ . Hoewel deze kit geleverd wordt als atrazinekit, is hij gezien de kruisreactiviteiten groepspecifiek. De kruisreactiviteiten voor diverse verbindingen zijn in de onderstaande tabel weergegeven.

<u>verbinding</u>	<u>d.l.</u>	<u>50% B/B0</u>	<u>kruisreactiviteit</u>
Atrazine	0,046	0,72	100
propazine	0,033	0,74	97
ametryn	0,053	0,39	185
prometryn	0,054	0,64	113
prometon	0,056	2,22	32
desethylatrazine	0,062	3,21	22
terbutryn	0,090	5,50	13
terbutylazine	0,310	15,5	4,6
simazine	0,340	4,90	15
desisopropyl-atrazine	0,800	217	<1
cyanazine	1,0	>10.000	<1
2-hydroxy-atrazine	1,1	148	<1

NB: d.l. is de detectielimiet berekend op 90% B/B0; d.l. en 50% B/B0 waarden zijn gegeven in  $\mu\text{g/l}$ ; de kruisreactiviteit is gegeven in %.

## Bijlage 10

Voor de volgende verbindingen werd geen reactiviteit gevonden bij concentraties tot 1000 µg/l: aldicarb, aldicarbsulfon, aldicarbsulfoxyde, alachloor, benomyl, butachloor, butylaat, captan, carbaryl, carbendazim, carbofuran, 2,4-D, 1,3-dichloorpropeen, dinoseb, MCPA, metolachloor, metribuzin, pentachloorfenol, picloram, propachloor, terbufos, thiabendazool en thiofanaat-methyl.

Volgens de bijsluiter is de recovery van atrazine, dat geaddeerd werd aan diverse watertypen (n=5), ca. 90 tot 100% bij een concentratie tussen 0,05 en 4,0 µg/l. De bijsluiter geeft een precisie van 4 tot 7% C.V. (intra-assay variatie) en 1 tot 5% C.V. (inter-assay variatie), N=5. In door ELTI Support uitgevoerde evaluatie-onderzoek werd voor de kit controle een inter-assay variatie gevonden van 13% C.V. bij een gemiddelde concentratie van 3,33 µg/l met een S.D. van 0,44 µg/l (n=6).

De atrazinekit is volgens de gegevens van de producent vrij robuust. Diverse stoffen werden getest op beïnvloeding van de resultaten. Deze zijn in geteste concentraties weergegeven in de volgende tabel.

<u>Stof</u>	<u>Concentratie</u>
Nitraat	250 mg/l
ijzer	100 mg/l
magnesium	250 mg/l
calcium	250 mg/l
natriuthiosulfaat	250 mg/l
sulfaat	250 mg/l
sulfiet	100 mg/l
humuszuren	100 mg/l
sulfide	100 mg/l
koper	250 mg/l
nikkel	250 mg/l
natriumchloride	0,65 M

In principe kunnen watermonsters direct gemeten worden. Bij sterk afwijkende pH wordt aangeraden deze te stellen op ongeveer pH 7,0. Monsters met veel vaste deeltjes kunnen het best eerste gefiltreerd worden.

### 3. Onvoldoende bekende aspecten

Afhankelijk van de samenstelling van praktijkmonsters zal nagegaan moeten worden of filtratie nodig is, om matrixverstoringen tegen te gaan, en welk effect dit heeft op de gevonden waarden.

De "nauwkeurigheid" voor diverse watertypen en de verschillende metaboliëten en andere triazineverbindingen zal nog bepaald moeten worden. Tevens zal de lineariteit aan de hand van een of meer praktijkmonsters met hoge concentraties bepaald moeten worden. Omdat praktijkmonsters heel verschillend kunnen zijn qua samenstelling, zullen matrixeffecten voor diverse watertypen bepaald moeten worden. Verder ontbreken praktijkgegevens voor de intra-assay variatie.

### 4. Kosten en tijdsaspecten

De atrazinekit wordt geleverd in een uitvoering met 30 buizen en een met 100 buizen. Voor de duur van de assay maakt dit niet veel uit en hij neemt in totaal, inclusief berekening, 4 uur in beslag. De kit kan ook in delen gebruikt worden, afhankelijk van het monsteraanbod. In een 30-buizenkit

kunnen maximaal 6 monsters in triplo gemeten worden. In een 100-buizenkit maximaal 30 monsters.

De hier besproken kit is afkomstig van J.T. Baker (kosten Fl. 1075,00 (100 buizen kit)). Er werd voor deze leverancier gekozen, omdat deze kit het meest uitvoerig geëvalueerd is.

Met uitzondering van het magnetische scheidingsrek zijn alle materialen normaal aanwezig op een lab. Het rek is verkrijgbaar bij J.T. Baker voor Fl. 1500,00.

Verder zal over het algemeen een eenmalige kapitaalinvestering voor een eenvoudige spectrofotometer noodzakelijk zijn (verkrijgbaar bij diverse leveranciers in verschillende prijsklassen vanaf ongeveer Fl. 5.250,00 (J.T. Baker)).

## Isoproturon (stofspecifieke immunoassay)

### 1. Inleiding

Immunoassay ontworpen voor de specifieke en selectieve detectie van isoproturon. Deze immunoassay kan bijvoorbeeld naast de groepspecifieke fenylureumherbicidekit gebruikt worden in gevallen dat er een vermoeden bestaat, dat specifiek isoproturon in het water voorkomt. De assay is een competitieve ELISA vergelijkbaar met die van de fenylureumherbiciden-kit. Voor het principe van de reactie en de berekeningswijze wordt naar de beschrijving van deze fenylureumherbicidenkit verwezen.

### 2. Bekende gegevens

De isoproturonkit is in een praktijkonderzoek reeds geëvalueerd. Volgens de bijsluiter heeft de kit een detectielimiet van 0,02  $\mu\text{g/l}$  isoproturon, bepaald bij 85% B/B0, en een lineair meetbereik van 0,05-0,50  $\mu\text{g/l}$ . In het evaluatie-onderzoek kon een detectielimiet bereikt worden van 0,01  $\mu\text{g/l}$ .

De specificiteit van de kit kan afgeleid worden uit de kruisreactiviteiten voor andere verbindingen, met name andere fenylureumverbindingen. Deze kruisreactiviteiten zijn weergegeven in de onderstaande tabel.

<u>verbinding</u>	<u>d.l.</u>	<u>50% B/B0</u>	<u>kruisreactiviteit</u>
isoproturon	0,02	0,13	100
chloorbromuron	85	1000	< 1
chloortoluron	6	165	< 1
chloroxuron	> 100	> 1000	< 1
diuron	7	475	< 1
fenuron	> 100	> 1000	< 1
fluometuron	> 100	> 1000	< 1
linuron	46	2249	< 1
metobromuron	3	46	< 1
metoxuron	47	> 1000	< 1
monolinuron	41	442	< 1
monuron	5	104	< 1
nuburon	6	586	< 1
siduron	> 100	> 1000	< 1
4-isopropylaniline	30	306	< 1

NB: d.l. is de detectielimiet berekend op 85% B/B0; d.l. en 50% B/B0 waarden zijn gegeven in  $\mu\text{g/l}$ ; de kruisreactiviteit is gegeven in %.



## Bijlage 10

In het genoemde praktijkonderzoek werden 10 watermonsters (5 leidingwater, 5 Lekkanaalwater), waaraan 10 verschillende fenylureumverbinding in variërende concentraties waren toegevoegd, met de kit gemeten. De recovery voor isoproturon was gemiddeld 110% (n = 6) met een correlatiecoëfficiënt voor de lineariteit van gemiddeld 0,9914 (n = 4), hetgeen inhoudt dat de nauwkeurigheid goed is.

Wat betreft de precisie werd de inter-assay variatie bepaald aan de hand van controlemonsters, die in 10 verschillende runs werden meegenomen. Deze varieerde van 3,2% C.V. voor drinkwater met 0,2 µg/l isoproturon tot 26% C.V. voor drinkwater met 0,05 µg/l en 16,4% C.V. voor Lekkanaalwater met 0,05 en 0,2 µg/l isoproturon. De intra-assay variatiecoëfficiënt werd bepaald in ongefiltreerd Waalwater met 0,2 µg/l isoproturon en bleek 13,3% (n = 5).

### 3. Onvoldoende bekende aspecten

Een immunoassay kan beïnvloed worden door de pH van het monster, de aanwezigheid van organische oplosmiddelen en matrixeffecten (bijv. vaste deeltjes en humuszuren). In het hier genoemde evaluatie-onderzoek bleek, dat er een verschil was tussen drinkwater en gefiltreerd Lekkanaalwater wanneer hier 10 verschillende verbindingen aan werden toegevoegd. Lekkanaalwater gaf ongeveer 10-20% hogere waarden. Bovendien leek het erop, dat vaste deeltjes de gemeten waarden beïnvloeden.

De "nauwkeurigheid", recovery en matrixeffecten voor diverse typen watermonsters moeten aan de hand van monsters van bekende samenstelling nader bepaald worden, waarbij de gevonden waarden voor isoproturon vergeleken moeten worden met die van een referentiemethode. Over de lineariteit zijn tot nu geen gegevens bekend. Wat betreft de precisie zijn in beperkte mate de inter-assay en de intra-assay variatie bepaald.

Tot slot kan drift, als gevolg van verschillen in reactietijd binnen een serie metingen, nog een rol spelen. Het is gebleken, dat de isoproturonkit, wanneer hij in 2 delen wordt gebruikt, weinig drift vertoont.

### 4. Kosten en tijdsaspecten

Bij gebruik van een volle microtiterplaat (8 strips) zijn 96 putjes beschikbaar. Naast de standaarden kunnen dan 28 watermonsters in triplo gemeten worden. Bij een lager monsteraanbod kan de kit ook 2 of meer keren gebruikt worden, waarbij echter het totale aantal monsters relatief minder wordt omdat elke keer de standaarden meegenomen moeten worden. Een assay neemt inclusief berekening in totaal ongeveer 4 uur in beslag.

De kosten van een isoproturonkit (Millipore) bedragen 1075,00 (excl. BTW). Een soortgelijke kit is tevens bij Ensys verkrijgbaar. Verder zal over het algemeen een eenmalige kapitaalinvestering voor een microtiterplaatreaders noodzakelijk zijn (verkrijgbaar bij diverse leveranciers in verschillende prijsklassen vanaf ongeveer Fl. 6.000,00 (Microtiterplaat Stripreader van Millipore))

## Cyclodiënen (groepspecifieke immunoassay)

### 1. Inleiding

Immunoassay voor de groepspecifieke detectie van cyclodiënen, waaronder endosulfan, endrin, dieldrin, aldrin, chloordaan en heptachloor. De assay is een competitieve ELISA vergelijkbaar met die van de fenylureumherbiciden-kit. Voor het principe van de reactie wordt naar de beschrijving van de fenylureumherbicidenkit verwezen. Deze kit is echter in tegenstelling tot de hierboven beschreven assays kwalitatief. De standaardconcentraties zijn relatief hoog, zeker wanneer het de bedoeling is in watermonsters te meten. Omdat echter voor het maken van de standaardcurve een stockoplossing met chloordaan in de kit wordt geleverd, kan naar eigen inzicht en behoefte een standaardcurve gemaakt worden over een ander concentratiebereik.

N.B. Voor deze assay is in principe geen berekening nodig, maar visueel wordt geschat of en zo ja of er veel of weinig cyclodiënen in een monster aanwezig zijn.

### 2. Bekende gegevens

De cyclodiënenkit is een groepspecifieke kit voor de kwalitatieve detectie van cyclodiënen. De standaard in de kit is chloordaan en de detectielimiet hiervoor is  $2,0 \mu\text{g/l}$ . Andere verbindingen uit deze groep kunnen echter gedetecteerd worden in lagere concentraties. Deze gegevens zijn weergegeven in de volgende tabel.

Verbinding	d.l. ( $\mu\text{g/l}$ )
Endosulfan	0,5
endrin	0,5
dieldrin	0,9
chloordaan	2,0
aldrin	3,0
heptachloor	3,0
toxafeen	100,0

Het meetbereik voor chloordaan is  $10\text{-}100 \mu\text{g/l}$ , terwijl volgens de kitbijsluiter de detectielimiet voor de verschillende cyclodiënenverbindingen verschilt van  $0,5\text{-}100 \mu\text{g/l}$  (extrapolatie). Meer gegevens worden niet in de bijsluiter van de kit vermeld. Omdat er met deze kit geen eerder praktijkonderzoek werd uitgevoerd, zijn ook geen eigen gegevens bekend.

### 3. Onvoldoende bekende aspecten

De kit is bedoeld als kwalitatieve detectiekit en behalve detectielimieten worden in de bijsluiter geen specificaties gegeven. Dit betekent dat nauwkeurigheid, lineariteit, precisie, matrixeffecten en de invloed van vaste deeltjes nog bepaald moeten worden.

### 4. Kosten en tijdsaspecten

De kit bevat 20 testbuizen. Bij meting in duplo kunnen daarom maximaal 7 watermonsters gemeten worden. Door de korte incubatietijden is de totale duur van de assay, inclusief berekening, ongeveer 1,5-2 uur.

De kosten van een cyclodiënenkit bedragen Fl. 515,00 (Millipore). Verder zal over het algemeen een eenmalige kapitaalinvestering voor een eenvoudige spectrofotometer noodzakelijk zijn (verkrijgbaar bij diverse leveranciers in verschillende prijsklassen vanaf ongeveer Fl. 5.250,00 (J.T. Baker).



## BEPALING VAN "PLRP-S" EXTRAHEERBARE APOLAIRE TOT POLAIRE VERBINDINGEN IN OPPERVLAKTEWATER MET BEHULP VAN HPLC IN COMBINATIE MET UV OF DAD DETECTIE

### HPLC/UV-fingerprint na concentrering op een vaste fase extractie (SPE) voorkolom (fingerprint = niveau 1)

#### 1. Inleiding

De methode gaat uit van 5 à 20 ml gefiltreerd (oppervlakte)water. Dit wordt over een vaste fase extractie-kolom geleid, waarbij de organische verbindingen geadsorbeerd worden. De SPE-kolom is gevuld met een sterk adsorbens zoals bijvoorbeeld PLRP-s, om een zo hoog mogelijk rendement te verkrijgen. Na belading en een wasstap wordt met behulp van een schakelkraan het HPLC-eluens over de SPE-kolom geleid, waarbij de organische stoffen desorberen, en vervolgens op de analytische HPLC-kolom gescheiden worden (zie ook bijlage 7). Met behulp van een UV-absorptie detector worden de componenten gemeten.

De bovenstaande procedure kan, gebruikmakend van een groot-volume autosampler en on-line gekoppelde SPE/HPLC volledig geautomatiseerd worden uitgevoerd.

Indien uitgegaan wordt van niet-gefiltreerd water dient de apparatuur en de procedure hier op aangepast te worden. In deze module wordt uitgegaan van gefiltreerd water.

#### 2. Bekende gegevens

SPE/HPLC-UV methoden richten zich vaak op bestrijdingsmiddelen, waarvoor aantoonbaarheids-grenzen tussen 0,03 en 1  $\mu\text{g/l}$  worden gerapporteerd. In bijlage 7 worden voor een aantal doelstoffen (bestrijdingsmiddelen) de aantoonbaarheidsgrenzen gegeven en de daarbij horende prestatiekenmerken zoals in de literatuurreferenties zijn vastgesteld. Recoveries liggen voor deze stoffen op 60-100%.

De techniek van on-line gekoppelde SPE/HPLC/UV is erg robuust en bedrijfszeker en wordt o.a. bij Kiwa al meerdere jaren met succes toegepast voor de analyse van diverse groepen (polaire) bestrijdingsmiddelen (dinitrofenolen, fenylureum-herbiciden, N-methylcarbamaten, glyfosaat/AMPA, diverse mengsels uiteenlopende bestrijdingsmiddelen w.o. triazines en chloorfenoxycarbonzuren). Storing kan optreden bij hoge gehalten aan humeus materiaal, waardoor de lage concentraties aan doelstoffen gemaskeerd worden door een grote "humeuze bult". Door verdunning is dit probleem op te lossen, waarbij de aantoonbaarheidsgrens evenredig met de verdunning hoger wordt. De overige prestatiekenmerken worden hier niet door beïnvloed.

#### 3. Onvoldoende bekende aspecten

Specifiek voor de HPLC/UV-fingerprint, binnen het grotere kader van HPLC/UV methoden, zal het volgende onderzocht moeten worden:

- a. Optimalisatie SPE-condities (monstervolume, pH van het water, gebruik tegenionen, type en bedvolume van het adsorbens) met als doel een zo goed mogelijk interpreteerbaar piekenpatroon te krijgen en een maximale recovery voor polaire verbindingen.
- b. Optimalisatie van de HPLC scheiding (kolomtype en dimensies, eluens-samenstelling, temperatuur) met als doel een zo goed mogelijk interpreteerbaar piekenpatroon te krijgen.

## Bijlage 11

- c. Optimalisatie van de UV-detectie (golflengte) om zo gevoelig mogelijk te meten en een zo kenmerkend mogelijk piekenpatroon te krijgen.
- d. Definiëren van een adequate kwaliteitsparameter (som van de pieken, aantal pieken, ...)
- e. Vaststellen van kenmerkende (grens)waarden van de groepsparameter onder d. voor schoon, onverdacht, verdacht, vervuild en sterk vervuild water.
- f. Validatie van de methode (herhaalbaarheid en (binnen-laboratorium) reproduceerbaarheid);

Daarnaast zal de methode vertrouwen moeten winnen door zich te bewijzen bij de toepassing van de techniek voor uiteenlopende praktijkmonsters. Voor implementatiedoelinden zal bovendien het opstellen van een werkvoorschrift en een opzet voor kwaliteitsborging van belang zijn.

### 4. Kosten en tijdsaspecten

De looptijd van één analyse zal circa 60 tot 90 minuten bedragen. Analyses worden volgtijdelijk uitgevoerd, waarbij bij een geautomatiseerde opzet dit onbewaakt en buiten kantooruren kan doorlopen.

Apparatuur voor HPLC/UV is in ruime mate op commerciële basis beschikbaar. Veelal zal de benodigde apparatuur bij de laboratoria van oppervlaktewaterbeheerders aanwezig zijn. Dit geldt ook voor de benodigde gegevensverwerkende apparatuur. De benodigde chemicaliën en andere materialen zijn als basismateriaal standaard op laboratoria aanwezig.

Dit houdt in dat alle benodigdheden voor implementatie van de groepsparameter "HPLC/UV-fingerprint" in principe voorhanden zullen zijn. Waar dit niet zo is hebben de kosten primair betrekking op investeringskosten voor apparatuur.

