

Trends in de analyse en identificatie van organische microverontreinigingen in water*

Inleiding

Door de ontwikkelingen in de wetgeving op nationaal en Europees niveau over de drinkwaternormen is de afgelopen jaren het belang van de analyse van organische microverontreinigingen in drinkwater en in de bronnen sterk toegenomen. Maar ook in meer algemene zin heeft een groeiend bewustzijn van de bedreiging van de kwaliteit van grond- en oppervlaktewater een sterke impuls gegeven aan het onderzoek naar organische stoffen.



TH. H. M. NOIJ
KIWA NV
Onderzoek en Advies



F. L. SCHULTING
KIWA NV
Onderzoek en Advies

Het meest sprekende voorbeeld van de gevolgen van de wetgeving op de activiteiten van waterleidinglaboratoria is wel de drinkwaternorm voor bestrijdingsmiddelen, die stelt dat de maximale toelaatbare concentratie in drinkwater per individueel bestrijdingsmiddel 0,1 µg/l bedraagt. De aanwezigheid van een aantal bestrijdingsmiddelen in het drinkwater van verschillende waterleidingbedrijven in de jaren tachtig heeft geleid tot een intensivering van studies naar het voorkomen van bestrijdingsmiddelen en onderzoek naar nieuwe waterbehandelingstechnieken. Ter ondersteuning van dit onderzoek en ter bewaking van de drinkwaterkwaliteit en de kwaliteit van de bronnen werd een veel groter beroep gedaan op de inzet van de laboratoria. Dit geldt zowel voor het aantal verschillende parameters als voor het aantal monsters dat geanalyseerd moet worden. Bovendien moesten ook nieuwe verbindingen gemeten kunnen worden, waardoor de laboratoria extra inspanningen moesten leveren op het gebied van de ontwikkeling van nieuwe analysemethoden.

* Dit artikel is gebaseerd op de voordrachten 'Meetmethoden: Trends op het gebied van analyse-technieken' (42e Vakantiecursus in drinkwatervoorziening, Delft, 11-12 januari 1990) en 'Trends in analytical techniques for the analysis and identification of organic micropollutants in water' (IWSA/AIDE European specialised conference on recently identified pollutants in water resources-Drinking water treatment in the nineties, Amsterdam, 1-2 September 1992).

Samenvatting

Door (inter)nationale wetgeving en een groeiend bewustzijn voor de waterkwaliteit is de laatste jaren de noodzaak sterk toegenomen om drinkwater, grondwater en oppervlaktewater te onderzoeken op de aanwezigheid van organische microverontreinigingen. Dit stelt evenwel hoge eisen aan de laboratoria die belast zijn met dit onderzoek: zeer lage concentraties van veelal polaire verbindingen moeten gemeten worden, veel verschillende verontreinigingen moeten geanalyseerd worden in veel verschillende monsters, veel en betrouwbare analyseresultaten moeten worden geproduceerd, en het moet snel en het mag niet te veel kosten. Dit betekent dat waterlaboratoria toegerust moeten zijn met de geschikte analyse-instrumenten en technieken om aan deze eisen te kunnen voldoen. De laatste jaren hebben verschillende ontwikkelingen plaatsgevonden op het gebied van de analyse en de identificatie van organische microverontreinigingen in water. Hierdoor konden veel nieuwe verbindingen geanalyseerd worden en is de kennis over het voorkomen en het gedrag van organische microverontreinigingen sterk toegenomen.

In deze publikatie worden de belangrijkste trends in chromatografische analyse-technieken, massaspectrometrie, automatisering en immunochemische methoden belicht en wordt hun toepasbaarheid voor de analyse van organische microverontreinigingen in water besproken.

Deze ontwikkelingen hebben grote gevolgen gehad voor het onderzoek naar organische microverontreinigingen en het werk van de laboratoria:

- Er is een noodzaak om vooral polaire verbindingen te analyseren zoals de nieuwe generatie bestrijdingsmiddelen; polaire verbindingen zijn moeilijk te isoleren uit water en ook moeilijk te analyseren.
- Lage concentraties (voor bestrijdingsmiddelen < 0,1 µg/l) moeten gemeten kunnen worden in een complexe matrix die enkele milligrammen per liter water aan opgelost organisch koolstof bevat.
- In een gecompliceerde matrix (veel verschillende verbindingen aanwezig) moet een eventueel positief resultaat worden bevestigd met een massaspectrometrische analyse of een tweede onafhankelijke methode.
- Er worden hoge eisen gesteld aan de betrouwbaarheid van de opgegeven resultaten; de toegepaste methodes moeten valide en robuust zijn en dit moet frequent worden vastgesteld aan de hand van kwaliteitscontroles.
- De analyseresultaten moeten snel beschikbaar zijn.
- Ondanks het gebruik van geavanceerde technieken, kostbare instrumenten en hoog opgeleid personeel moet al het mogelijke worden gedaan de analysekosten beheersbaar te houden.
- Een groot aantal analyses moet uitgevoerd worden, de resultaten moeten verwerkt worden en vaak ook nog onderling vergeleken.

Ook de analytische technieken en instrumenten hebben de afgelopen jaren de nodige ontwikkelingen doorgemaakt. Een aantal van deze technieken kan een

belangrijke rol spelen bij het oplossen van de nieuwe problemen van de drinkwaterlaboratoria. In laboratoria waar een aantal van deze technieken werd geïntroduceerd is dan ook een duidelijke toename van de analytische mogelijkheden waarneembaar: tegenwoordig zijn aanzienlijk meer bestrijdingsmiddelen analyseerbaar dan een tiental jaren terug (circa 50% van de toegelaten middelen ten opzichte van 10-15% tien jaar geleden), het aantal geïdentificeerde organische microverontreinigingen is toegenomen van enkele honderden tot enkele duizenden en in het algemeen is de betrouwbaarheid van de resultaten, zowel kwalitatief als kwantitatief, aanzienlijk verbeterd. Dit artikel geeft een overzicht van de meest belangrijke trends in analytische technieken en geeft weer wat er de laatste jaren op dit gebied bij waterleidinglaboratoria is bereikt.

Onderzoek waterkwaliteit

Bij het onderzoek naar de waterkwaliteit zijn er twee verschillende werkwijzen te onderscheiden:

- een stofgerichte aanpak en
- een breed screenende aanpak.

Bij een stofgerichte aanpak wordt het watermonster onderzocht op de aanwezigheid van een aantal van te voren bekende verbindingen, die uit het oogpunt van waterkwaliteit van belang zijn (te denken valt aan bestrijdingsmiddelen, carcinogene verbindingen, geur- en smaakstoffen, etc.). De desbetreffende analysemethode geeft kwantitatieve informatie (concentraties) en is zo specifiek mogelijk om voor een maximale betrouwbaarheid van het analyseresultaat te zorgen. Om de analysecapaciteit optimaal te benutten

wordt gebruik gemaakt van multi-methoden: de gelijktijdige analyse van een groot aantal verbindingen in één bepaling. Bevestiging van de identiteit van een mogelijk aanwezige verbinding met behulp van bijvoorbeeld massaspectrometrie is vaak noodzakelijk. In de breed-screenende aanpak wordt gezocht naar onbekende verbindingen die mogelijk een nadelige invloed hebben op de waterkwaliteit. De toegepaste methode is zo universeel mogelijk wat betreft isolatie, chromatografische scheiding en detectie. Het gaat bij dit type onderzoek vooral om het benoemen van onbekende verbindingen waarbij doorgaans gebruik wordt gemaakt van massaspectrometrie. De methoden zijn slechts kwalitatief of hooguit semi-kwantitatief. Om het onderzoek te richten op verbindingen die uit toxicologisch oogpunt van belang (kunnen) zijn, kan vooronderzoek met behulp van bio-assays zoals de Ames-mutageniteitstest uitgevoerd worden [Van Genderen en Noordsij, 1991]. Uiteindelijk resulteert screeningsonderzoek in een lijst met in het water aangetoonde verbindingen. Vervolgens kunnen deze verbindingen aan de hand van literatuurgegevens over toxiciteit geëvalueerd worden en kan hun betekenis voor de waterkwaliteit vastgesteld worden [Van Genderen en Noij, 1991]. Doorgaans zal deze aanpak gevolgd worden door een stofspecifiek onderzoek voor relevante verbindingen wanneer kwantitatieve gegevens nodig zijn over het voorkomen in de drinkwaterbronnen en het gedrag bij waterbehandelingsprocessen.

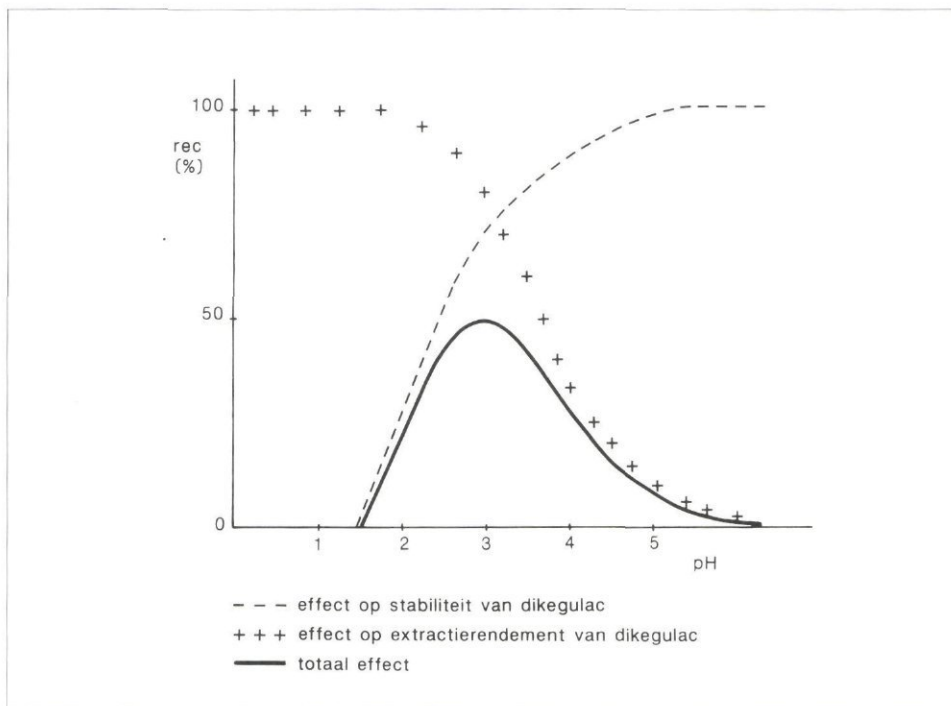
De analyse van organische microverontreinigingen in water

Bij het onderzoek naar de aanwezigheid van organische microverontreinigingen in water wordt voornamelijk gebruik gemaakt van chromatografie als analysetechniek: gaschromatografie (GC) voor de analyse van relatief vluchtige, minder polaire verbindingen en vloeistofchromatografie (HPLC) voor polaire en niet-vluchtige verbindingen. Voor beide technieken kan de gehele procedure worden verdeeld in de volgende processen:

- monsterneming
- monstervoorbewerking
- scheiding van de componenten
- detectie/identificatie
- gegevensverwerking

Monsterneming

Afhankelijk van de aard van de te analyseren verbinding en het monstertype kunnen monsterneming en monsterverwerking cruciale stappen zijn in de



Afb. 1 – Het effect van de pH van het monster op het extractierendement van Dikegulac; het zure karakter van Dikegulac vereist extractie bij een lage pH, de beperkte stabiliteit in zuur milieu vereist een hoge pH: een optimale opbrengst wordt bereikt bij pH=3 [Noij en Spruit, 1990].

hele procedure. Zowel nationaal als internationaal zijn richtlijnen op het gebied van monsterneming in ontwikkeling [ISO, 1991]. Op het gebied van monsterverwerking is helaas nog weinig informatie beschikbaar anders dan 'bewaren in het donker en bij lage temperaturen'. Conservering beperkt zich doorgaans tot het vermijden van oxydatie door luchtzuurstof of door residuen van vrij chloor en ook tot het uitsluiten in sommige methoden van biologische activiteit door het toevoegen van een geschikt conserveermiddel. Echter, voor de meeste methoden ontbreekt een systematische studie over houdbaarheid.

Monstervoorbewerking

Voordat een analyse uitgevoerd kan worden is vaak een monstervoorbewerkingsstap nodig om:

- de concentratie te vergroten tot op een meetbaar niveau
- de componenten te krijgen in een oplosmiddel dat geschikt is voor het meetinstrument (water is dat vaak niet)
- de detecteerbaarheid of de analyseerbaarheid van de component te verbeteren.

Bij de extractie van watermonsters waarbij uit bijvoorbeeld 1 liter water een concentraat van 1 ml in een organisch oplosmiddel wordt bereid, wordt aan de eerste twee aspecten voldaan. Chemische derivatisering zoals het veresteren van zuren met diazomethaan heeft het derde aspect tot doel.

Bij de analyse van microverontreinigingen op het niveau van 1 µg/l of lager is een maximale selectiviteit van de methode vereist om betrouwbare resultaten te verkrijgen. Ook bij de monstervoorbewerking kan door een juiste keuze van technieken de selectiviteit vergroot worden, waarbij ook de storende matrix zoveel mogelijk verwijderd wordt. De afgelopen jaren is er dan ook veel onderzoek verricht naar technieken voor monstervoorbewerking bij de milieu-analyses.

Scheiding van de componenten

Door het toegenomen belang van polaire en minder vluchtige organische microverontreinigingen wordt vloeistofchromatografie (HPLC) in de waterlaboratoria steeds vaker toegepast. Vooral nu het mogelijk is om in combinatie met massaspectrometrie (MS) of andere identificatietechnieken de identiteit van de componenten te bevestigen, zal deze trend zich zeker voortzetten. Echter, voor de analyse van complexe monsters blijft capillaire gaschromatografie (GC) de voorkeur genieten door het grote scheidend vermogen, de beschikbaarheid van verschillende gevoelige en selectieve detectoren en de eenvoudige koppeling met massaspectrometrie.

Een derde nieuwe en veelbelovende chromatografische techniek is capillaire elektroforese.

Detectie en identificatie

De laatste jaren hebben ontwikkelingen op dit gebied een nieuwe impuls gekregen met de introductie van zeer gevoelige, kleine ("bench-top") en gunstig geprijsde detectoren gebaseerd op spectroscopische principes. Hierbij wordt component-specifieke informatie verkregen zoals massaspectra en UV-absorptie spectra, die het mogelijk maken om de identiteit van de componenten te bevestigen of onbekende verbindingen te identificeren. Ook kan door gebruik te maken van bepaalde spectroscopische detectoren de selectiviteit van de methode als geheel verbeterd worden (atomaire emissie detector, chemiluminescentie detector).

Gegevensverwerking

De moderne analytische systemen produceren grote hoeveelheden aan gegevens:

- de ruwe data van chromatografische analyses, vooral als gebruik gemaakt wordt van full scan spectroscopische detectie (massaspectra, UV-spectra, IR-spectra, etc.)
- analyseresultaten van een toenemend aantal verschillende methoden, toegepast met een steeds grotere frequentie door een toenemend aantal laboratoria.

Dit houdt in het gebruik maken van computers voor de verwerking van de ruwe data om een betrouwbaar resultaat te verkrijgen (piekintegratie voor de kwantificering en spectrumvergelijking voor de identificatie) en opslag van de gegevens en het gebruik van chemometrische technieken om de grote hoeveelheid analyseresultaten om te zetten in analytische informatie (trendanalyse, normtoetsing, etc.). In alle voornoemde onderdelen van de gehele procedure voor de analyse van water vinden ontwikkelingen plaats. Tabel I geeft een overzicht van de meest

TABEL I - Trends in analytische technieken.

Monstervoorbewerking
- vaste fase extractie
- superkritische extractie
- elektroforetische voorscheiding
- dialyse
Chromatografische scheiding
- geminiaturiseerde capillaire GC
- micro-HPLC en capillaire LC
- superkritische fluid chromatografie
- elektroforese
- gekoppelde technieken
Detectie/Identificatie
- benchtop GC/MS
- ion trap detectie
- LC/MS
- fotodiode array detectie
- atomaire emissie detectie
- infrarood detectie
Immuno assays
Automatisering

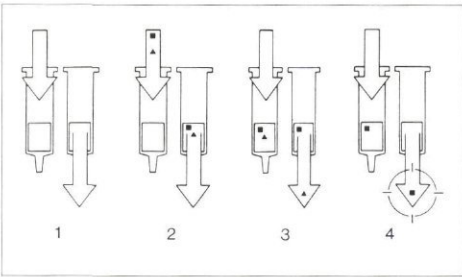
belangrijke. Slechts een aantal hiervan zal in dit artikel nader worden besproken waarbij de nadruk komt te liggen op de toepasbaarheid voor de analyse van watermonsters. Bovendien komt ook de mogelijkheid tot automatiseren, vaak door het koppelen van verschillende technieken, aan de orde.

Monstervoorbewerking

Vaste fase extractie (SPE)

Een aantal jaren geleden - en ook nu nog - was het gebruikelijk om voor de analyse van lage concentraties van organische verbindingen in water een monstervolume van bijvoorbeeld 1 liter te extraheren met 100 of 200 ml van een niet-mengbaar organisch oplosmiddel zoals dichloor-methaan, ethylacetaat of hexaan. Vervolgens werd na droging het extract ingedampt tot een eindvolume van circa 1 ml, wat overeenkomt met een concentratiefactor van 1.000 wat voldoende is voor de meeste GC- en HPLC-analyses. Nadelen van deze manier van monstervoorbewerking zijn het tijdrovende karakter ervan, de kosten van het gebruik van grote volumina zeer zuiver organisch oplosmiddel, de belasting van het milieu om de afgewerkte oplosmiddelen te verwerken en de gezondheidsaspecten voor analisten bij het werken met dergelijke oplosmiddelen.

Deze nadelen zijn niet of veel minder aanwezig bij vaste fase extractie. Hierbij wordt het watermonster geleid door een kolom gevuld met een geschikt adsorbens en vervolgens na droging geëluëerd met slechts enkele milliliters van een organisch oplosmiddel (zie afb. 2). Bijkomend voor-



Afb. 2 - Procedure voor vaste fase extractie. 1 = conditioneren; 2 = adsorptie van de organische verbindingen uit een groot volume water; 3 = wasstap en clean-up; 4 = elutie, waarbij het uiteindelijke concentraat wordt verkregen.

deel is dat de gevoeligheid van de methode op een eenvoudige wijze verbeterd kan worden door een groter monstervolume in bewerking te nemen (met in samenhang daarmee een grotere adsorptiekolom), waardoor een concentratiefactor van 20.000 of groter bereikt kan worden en waarbij het

concentraat ook gebruikt kan worden voor bio-assays zoals de Ames-test [Noordsij, Van Beveren en Brandt, 1983]. De selectiviteit van de methode kan geoptimaliseerd worden door een juiste combinatie van adsorbens en elutiemiddel. Een overzicht van de meest gebruikelijke adsorbentia is weergegeven in tabel II [Liska, Krupcik en Leclercq, 1989].

TABEL II - Adsorbentia voor SPE.

polymere materialen:	gebonden silicas:
Porapak	Octadecyl (C18)
Chromosorb	Octyl (C8)
XAD	Diol
PRP	Cyanopropyl
Tenax	Amino
ionenwisselaars:	koolstofhoudend:
Sulfon zuur	Carbopack
Carboxyl zuur	Actief kool
Quaternair ammonium	
Secundair amine	

Een groot voordeel van SPE is de mogelijkheid tot automatiseren. Dit is zeker van belang bij de analyse van een groot aantal monsters, maar ook als de chromatografische analyse tijdrovend is. Verschillende instrumenten voor de geautomatiseerde vaste fase extractie zijn tegenwoordig verkrijgbaar, zowel voor on-line procedures als off-line. De on-line combinatie van SPE met HPLC is in verschillende toepassingen relatief eenvoudig te realiseren [Frei en Zech, 1988], terwijl ook de on-line koppeling met GC mogelijk is [Grob, 1991], zij het dat dit aanzienlijk gecompliceerder is (zie verderop). Behalve voor de extractie kunnen vaste fase extractie kolommen ook gebruikt worden voor de clean-up van extracten.

Superkritische extractie (SFE)

Superkritische fluids bieden de mogelijkheid om de selectiviteit van de extractie te verbeteren door een juiste combinatie van temperatuur, druk, extractiemiddel en modifiers (zie ook 'superkritische fluid chromatografie', verderop in dit artikel). De directe superkritische extractie van water is niet erg gebruikelijk en de literatuur over SFE beschrijft dan ook vooral de extractie van vaste materialen: grond, plantaardig materiaal, weefsel, e.d. [Hawthorne, 1990]. In combinatie met vaste fase extractie van watermonsters biedt de elutie met superkritische fluids zeker bepaalde voordelen: behalve de al genoemde selectiviteit kan het indampen van het eluaat bij lagere temperaturen gebeuren dan bij normale oplosmiddelen (vaak zelfs ver beneden kamertemperatuur), waardoor de indampverliezen voor vluchtige verbindingen vermeden kunnen worden. Bovendien is kooldioxyde, dat in veel SFE-toepassingen

gebruikt wordt, goedkoop, niet-giftig en verkrijgbaar in een hoge graad van zuiverheid.

De apparatuur voor SFE is commercieel verkrijgbaar en een aantal kan direct gekoppeld worden aan instrumenten voor GC of SFC.

Chromatografische scheiding

Geminiaturiseerde capillaire gas-chromatografie

Eén van de eisen die aan analyse-resultaten gesteld worden is dat zij snel beschikbaar zijn. Een mogelijkheid hiertoe bij gaschromatografie is de analyse te versnellen door gebruik te maken van capillaire kolommen met een zeer kleine inwendige diameter, bijvoorbeeld 50 μm in plaats van de gebruikelijke 250 of 320 μm (zie afb. 3). Afhankelijk van de drukval over de kolom neemt de analyse-tijd lineair tot kwadratisch af met de afname van de kolomdiameter [Cramers, 1986]. Ook de piekbreedte neemt in dezelfde mate af wat hoge eisen stelt aan injectietechniek, detectorontwerp en elektronica. Bovendien neemt ook het monstervolume dat nog geïnjecteerd kan worden af: van μl 's tot enkele tientallen nl's, wat een nadelig effect heeft op de analyse van zeer lage concentraties [Noij, Curvers en Cramers, 1986]. Een en ander

heeft tot gevolg gehad dat de introductie van capillaire GC met kolommen met zeer kleine inwendige diameter beperkt is gebleven tot enkele specifieke toepassingen in draagbare GC's en micro-GC instrumenten.

In de praktijk lijkt het gebruik van kolommen met inwendige diameters kleiner dan 100 μm voorsnog niet zinvol, en zeker niet bij de analyse van zeer lage concentraties. De tijdswinst die de chromatografische scheiding oplevert weegt niet op tegen de extra inspanning nodig bij de monstervoorbewerking.

Superkritische fluid chromatografie (SFC)

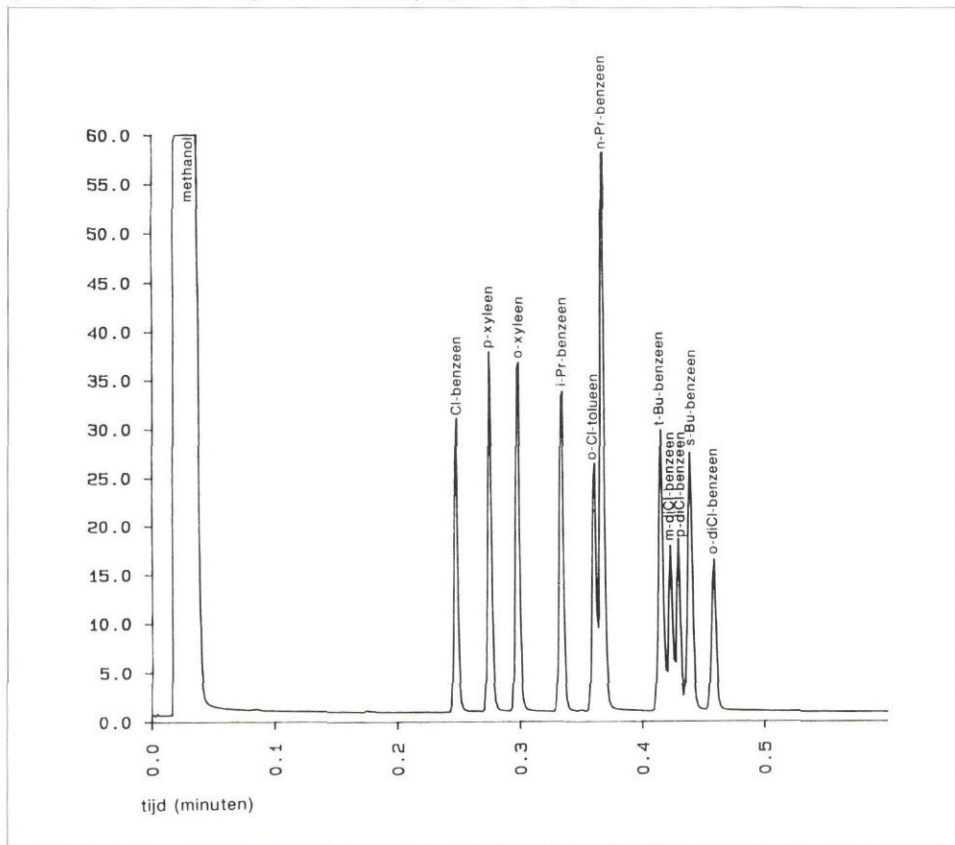
Als een tussenvorm tussen gaschromatografie en vloeistofchromatografie leefde enkele jaren geleden het idee dat door gebruik te maken van superkritische fluids als mobiele fase, SFC de voordelen van zowel GC als HPLC zou kunnen combineren: een betere scheiding door de combinatie van efficiency (GC) en selectiviteit (HPLC), betere detectie (GC) en een breed toepassingsgebied (HPLC) [Smith, 1988]. Theoretisch klopt dit ook wel, in de praktijk blijken de voordelen van een derde chromatografische techniek als aanvulling op GC en HPLC zeer beperkt te zijn. SFC is een gecompliceerde techniek met een groot aantal parameters

die zowel de scheiding als de detectie beïnvloeden: keuze van de mobiele en stationaire fase, het gebruik van modifiers en ook temperatuur en druk. En ook het gebruik van de apparatuur, hoewel het nu commercieel verkrijgbaar is, vereist de nodige ervaring. Bovendien, de problemen die met SFC beter opgelost konden worden dan met GC of HPLC bleken beperkt te zijn tot de analyse van enkele thermolabele, relatief vluchtige verbindingen. De ontwikkelingen op het gebied van LC/MS, LC-detectie en kolomtechnologie bij GC hebben de rol van SFC verder teruggedrongen.

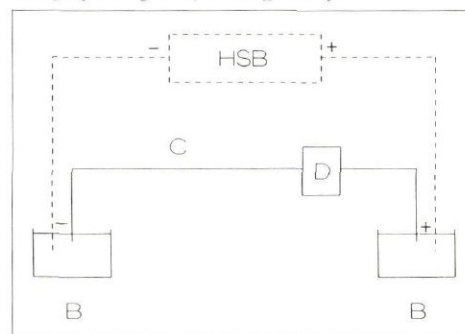
Elektroforese (EF)

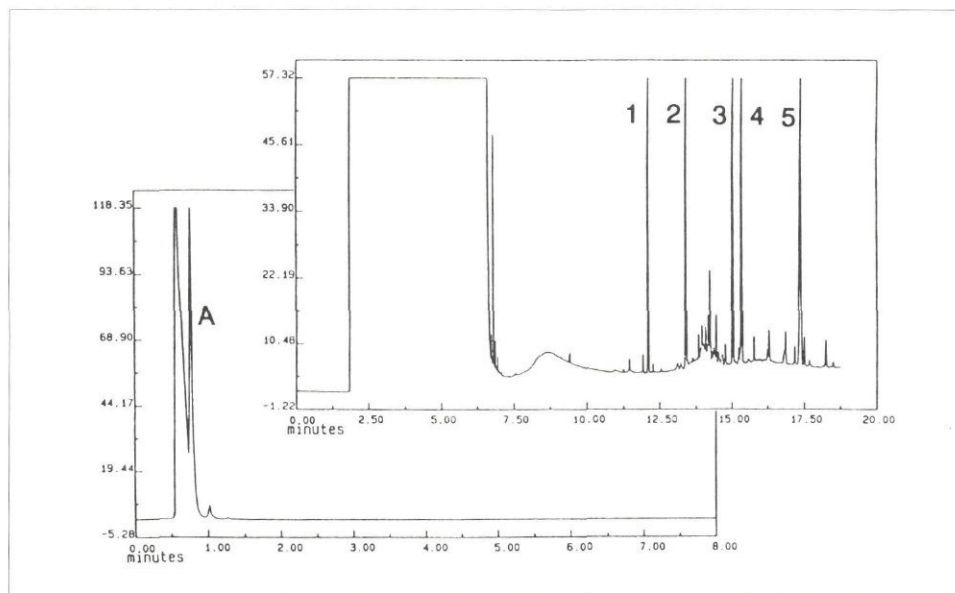
Bij elektroforese vindt de scheiding van ionen plaats op grond van het verschil in mobiliteit van deze ionen in een elektrisch veld. Ondanks het feit dat elektroforese al geruime tijd als analysetechniek succesvol wordt ingezet, vooral in biomedische toepassingen, kwam de echte doorbraak toch pas halverwege de jaren tachtig, toen de mogelijkheden van elektroforetische scheidingen uitgevoerd in capillairen met zeer kleine diameters werd beschreven [Jorgenson en Lukacs, 1983; Knox en McCormick, 1989]. Vervolgens zijn er verschillende uitvoeringsvormen van elektroforese tot ontwikkeling gekomen, waaronder capillaire zone elektroforese (CZE). Hierbij worden de ionen gescheiden in een capillaire buis die gevuld is met een gebufferd elektrolyet, waarover een elektrische spanning wordt gezet (bijvoorbeeld: 20kV over een capillair van 100 cm lengte en een inwendige diameter van 50 μm die gevuld is met een chloride/fosfaat-buffer van pH=7,5). In een dergelijk systeem, waarbij geen hydrodynamische flow wordt gebruikt kan een zeer grote scheidings-efficiency bereikt worden. Evenals bij geminiaturiseerde GC geldt ook hier dat het injectievolumen slechts enkele nl's mag bedragen, waardoor op dit moment de bruikbaarheid voor de analyse

Afb. 3 - Zeer snelle analyse van 11 vluchtige aromaten binnen 30 seconden met behulp van capillaire GC op een kolom met een inwendige diameter van 50 μm [Janssen, 1992].



Afb. 4 - Schematische weergave van de apparatuur voor capillaire zone elektroforese (CZE). C = scheidingscapillair; D = detector; HSB = hoog-voltage spanningsbron; B = buffervatjes.





Afb. 5 - Gaschromatogram van polyaromatische koolwaterstoffen (PAK) verkregen met HPLC/GC [Leenderts, 1991]. 1 = fluoreen; 2 = fenantreen; 3 = fluoranteen; 4 = pyreen; 5 = verontreiniging. Onder: het overeenkomstige HPLC-chromatogram met A = totale PAK-fractie.

van zeer lage concentraties nog beperkt is. Het gebruik van lasergeïnduceerde fluorescentie detectie kan de gevoeligheid aanzienlijk verbeteren, maar is slechts toepasbaar voor een zeer beperkte groep verbindingen.

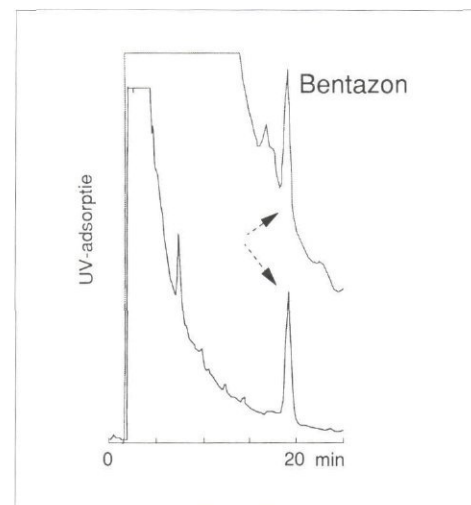
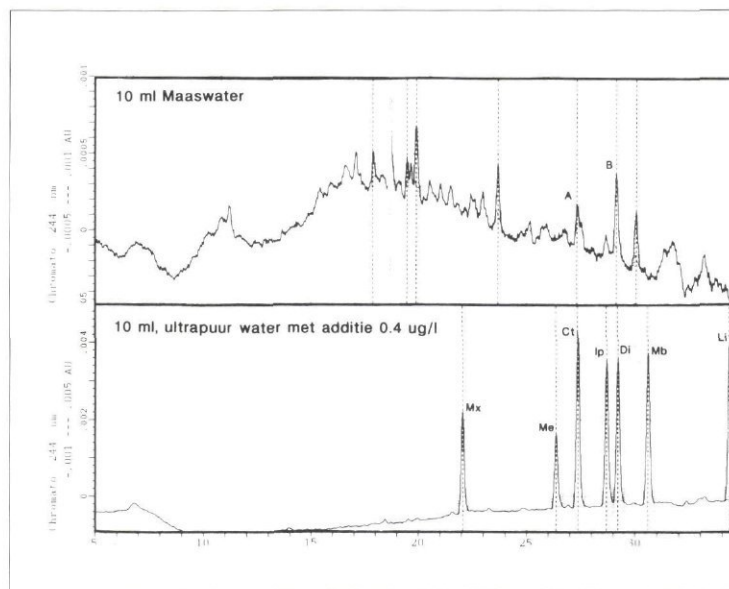
Capillaire elektroforese is een zeer elegante en veelbelovende techniek die zeker zal uitgroeien tot de derde grote chromatografische techniek naast GC en HPLC. Tot dusver ontbreekt het nog aan voldoende gevoeligheid om de techniek zinvol in milieu-analyses in te kunnen zetten, terwijl ook de herhaalbaarheid van de retentie nog onvoldoende is. Het is ook te verwachten dat over een aantal jaren deze problemen overwonnen zullen zijn door gebruik te maken van geschikte monstervoorbewerkingstechnieken, gevoeliger detectoren, on-column concentrering en de toepassing van additieven. Vooral ook met het groeiende belang van polaire en ionogene verbindingen bij de analyse van water zal elektroforese ook haar toepassing vinden in de milieu-analyses.

Gekoppelde chromatografische technieken

Het koppelen van twee chromatografische technieken kan als doel hebben de scheiding van de verschillende verbindingen bij de analyse te verbeteren, maar ook om de monstervoorbewerkings-techniek direct te combineren met de analyse. Een bekend voorbeeld van de eerste aanpak is het gebruik van zogenaamde tweedimensionale gaschromatografie: er vindt een voor-scheiding plaats op de eerste kolom waarbij het deel met een slechte resolutie door een 'heart-cut' wordt doorgestuurd

naar een tweede kolom (met andere stationaire fase) waar het verder gescheiden wordt. Hoewel het een elegante techniek is, is het nooit op grote schaal toegepast in milieulaboratoria. Meer vooruitzichten biedt de techniek waarbij HPLC on-line gekoppeld wordt met capillaire GC [Grob, 1991], met hetzelfde heart-cut principe als hierboven: een slecht gescheiden deel van het HPLC-chromatogram wordt verder gescheiden op de GC-kolom (zie afb. 5). Hoewel de injectie van een relatief groot volume (100-500 μ l) op een capillaire GC-kolom de nodige problemen met zich meebrengt, worden bij verschillende laboratoria met succes zelfgebouwde instrumenten toegepast terwijl ook commercieel een HPLC/GC-combinatie

Afb. 8 - HPLC-chromatogram van een oppervlaktewatermonster en een standaardoplossing van 7 fenylureum herbiciden (links). Rechts: de UV-spectra van twee met de herbiciden overeenkomende pieken (A en B) en de spectra van chloortoluron en diuron. Piek A bleek geen chloortoluron te zijn (concentratie: < 0,02 μ g/l), piek B daarentegen wel diuron (0,17 μ g/l) [Noij en Brandt, 1991].



Afb. 6 - Toepassing van de combinatie van isotachoforese en vloeistofchromatografie (ITP/HPLC) bij de analyse van bentazon. Boven: zonder ITP-voorbewerking; onder: met ITP. Door gebruik te maken van ITP is een aanzienlijke reductie van de storende achtergrond te bereiken, zonder dat de bentazon-piek (aangegeven door de pijl) afneemt [Hendriks et al., 1992].

verkrijgbaar is. Een speciale toepassing van deze combinatie is het gebruik van het HPLC-deel voor vaste fase extractie. Op deze wijze wordt een on-line koppeling van SPE en capillaire GC gerealiseerd.

Een tweede combinatie van verschillende chromatografische principes is elektroforese gekoppeld aan HPLC. Twee verschillende combinaties zijn beschreven: de koppeling van isotachoforese (ITP) aan HPLC (afb. 6) [Hendriks et al., 1992] en zone elektroforese (ZEST) gekoppeld aan HPLC [Debets et al., 1992]. Behalve het realiseren van een voorscheiding heeft ITP het voordeel dat het ook gelijktijdig als concentreringstechniek gebruikt kan worden. ZEST/HPLC is weliswaar een krachtigere scheidingstechniek, maar

hierbij treedt wél verdunning van het monster op.

Detectie en identificatie

Massaspectrometrie gekoppeld aan GC
Hoewel de koppeling van massaspectrometrie aan GC niet nieuw meer is, is er toch nog een aantal ontwikkelingen gaande: 1. verbetering van de gevoeligheid en 2. de beschikbaarheid van gunstig geprijsde bench-top instrumenten. De aanzienlijke verbetering van de MS-gevoeligheid van de benodigde 10-100 ng per component (voor een volledig massaspectrum) tot slechts enkele tienden van ng betekent dat massaspectrometrie qua gevoeligheid vergelijkbaar is geworden met de meer conventionele GC-detectoren als FID en NPD en in sommige gevallen ook ECD. Dit maakt het gebruik van massaspectrometrie in de milieu-analyses erg

TABEL III – Interfaces voor HPLC/MS.

Interface	Gevoeligheid ¹	Mol-gewicht	MS-info ¹	Verbindingen
Thermospray	++	150-5.000	++	apolair-polair
Plasmaspray	++	150-5.000	++	apolair-polair
Electrospray	+++	5.000-5.0000	+++	polair-ionen
Particle beam	+	< 1.000	++++	apolair
Atmospheric Press.CI	+++	100-50.000	++++	apolair-polair-ionen
FAB	+++	50-50.000	+	polair
vergelijk: GC/MS	++++	< 1.000	++++	apolair-polair

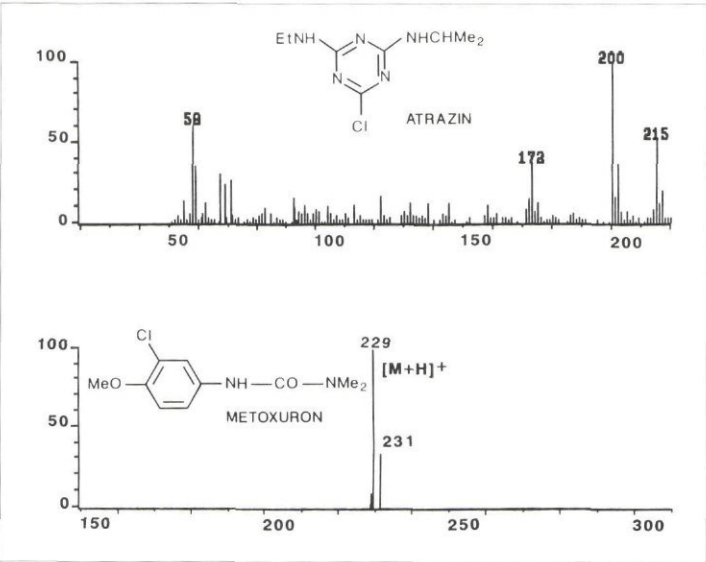
¹ ++++ = zeer goed; + = gering

aantrekkelijk, zeker daar waar in complexe monsters (en water is op het subµg/l-niveau een complex monster) een bevestiging van de identiteit noodzakelijk is: een foutieve interpretatie van de identiteit kan leiden tot – onterechte – grote financiële uitgaven voor zuiveringsprocessen, saneringen, etc. Maar ook het gebruik als universeel toepasbare, selectieve detector voor organische microverontreinigingen is door de grote gevoeligheid een serieuze optie geworden.

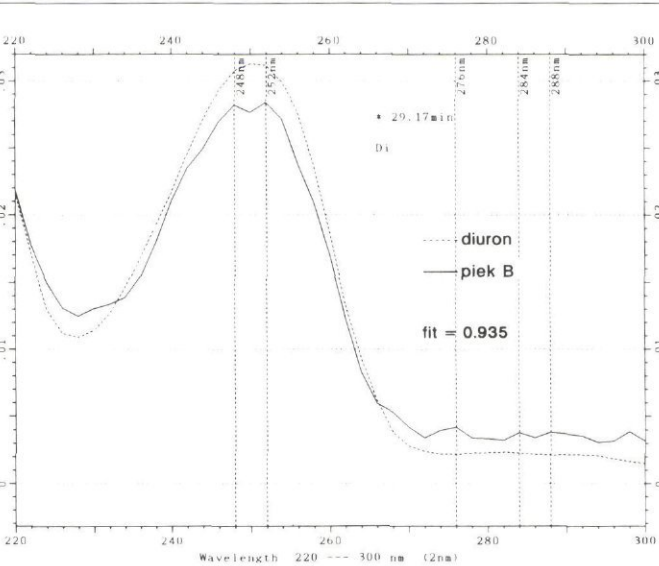
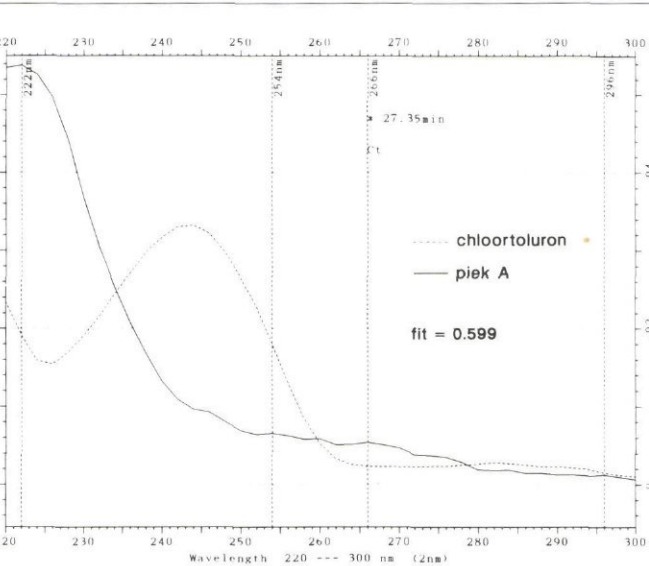
Massaspectrometrie gekoppeld aan HPLC

Bij HPLC-analyses is de noodzaak om de identiteit van een piek te bevestigen nog groter dan bij GC.
1. het aantal verbindingen dat met HPLC geanalyseerd kan worden is vele malen groter dan het GC-deel;
2. HPLC is een minder efficiënte scheidingstechniek dan GC;
3. er zijn nauwelijks selectieve detectoren met voldoende gevoeligheid beschikbaar bij HPLC;
4. het belang van HPLC als analyse-techniek neemt toe.

Oftewel, de kans op misinterpretatie bij HPLC-analyses is reëel aanwezig. De meest aangewezen weg om deze kans te minimaliseren is gebruik te maken van massaspectrometrie [Brown, 1990]. De koppeling van massaspectrometrie met HPLC is echter aanzienlijk gecompliceerder dan de GC/MS koppeling, én door de fase-overgang van vloeistof naar gas (of aerosol) zonder het verlies van de niet-vluchtige verbindingen, én omdat de massaflow van de mobiele fase bij HPLC aanzienlijk groter is dan bij GC, waardoor een constant vacuüm in de MS-bron moeilijker te handhaven is. De interfaces voor HPLC/MS zijn nog volop in ontwikkeling. Een overzicht van de meest gebruikelijke interfaces met daarbij



Afb. 7 – Voorbeelden van massaspectra verkregen met GC/MS (atrazin) en HPLC/MS (metoxuron). Het GC/MS-massaspectrum geeft veel meer informatie dan het HPLC/MS-spectrum.



enkele karakteristieken is weergegeven in tabel III.

Voor de meeste momenteel gebruikte interfaces is de spectruminformatie beperkt in vergelijking met GC/MS (zie afb. 7) en is nog onvoldoende om de identificatie van onbekende verbindingen mogelijk te maken. Ook de HPLC-scheiding zelf zou in dit verband verbeterd moeten worden, vooral om de storing van de achtergrond terug te dringen. Aangezien de ontwikkelingen voor HPLC/MS nog in volle gang zijn, is het te verwachten dat deze problemen voor een groot deel opgelost zullen worden. In combinatie met een verbeterde HPLC-scheiding (bijvoorbeeld gebaseerd op micro-HPLC) en een geschikte monstervoorbewerking of koppeling van technieken (bijvoorbeeld elektroforese en HPLC) zal het in de toekomst mogelijk zijn om ook met HPLC/MS watermonsters te onderzoeken op de aanwezigheid van relevante, maar nu nog onbekende, organische microverontreinigingen.

Foto-diode array detectie (PDA)

Een tweede manier om bij HPLC-analyses de identiteit van de verbindingen te bevestigen is gebruik te maken van foto-diode array detectie, waarbij door de detector het gehele UV-absorptiespectrum van de verbinding wordt opgenomen. Dit spectrum wordt vervolgens vergeleken met bibliotheekspectra (bij voorkeur opgenomen onder dezelfde HPLC-omstandigheden als de analyse). Voor deze vergelijking zijn diverse algoritmes ontwikkeld en er kan ook gebruik gemaakt worden van piekzuiverheidsalgoritmes gebaseerd op de absorptieverhouding bij verschillende golflengtes [Castledine *et al.*, 1992].

Ook hier is de gevoeligheid van de apparatuur aanzienlijk verbeterd waardoor de toepassingen voor de bevestiging van zeer lage concentraties sterk zijn toegenomen (afb. 8). Door de beperkte specificiteit van UV-spectra is de PDA voor bevestigingsdoeleinden niet voor alle verbindingen even goed bruikbaar, terwijl de identificatie van onbekende verbindingen op basis van UV-spectra onmogelijk is. Echter, voor veel doelstoffen van niet-natuurlijke oorsprong

zoals bijvoorbeeld bestrijdingsmiddelen biedt het gebruik van foto-diode array detectie ruime mogelijkheden voor de bevestiging van de identiteit.

Immuno assays

Als aanvulling op het analytisch-chemisch instrumentarium van de laboratoria zijn tegenwoordig immuno assays beschikbaar voor diverse milieutoepassingen [Jung *et al.*, 1989]. Het meest toegepaste type is de ELISA: Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay, die commercieel verkrijgbaar is voor verschillende bestrijdingsmiddelen.

Het principe van een ELISA is weer gegeven in afbeelding 9: een microtiterplaat is gecoat met een dragermateriaal waaraan het bestrijdingsmiddel-specifieke antilichaam gebonden is; bij de analyse wordt het monster tezamen met een tracer (die sterk op het bestrijdingsmiddel lijkt en aan een enzym gebonden is) in contact gebracht met het antilichaam waarna een evenwicht ontstaat tussen aan het antilichaam gebonden bestrijdingsmiddel en aan het antilichaam gebonden tracer; na de incubatie wordt alle niet-gebonden bestrijdingsmiddel en tracer in een wasstap verwijderd en wordt een

kleurreactie uitgevoerd met het tracerenzym waarna de kleuring fotometrisch wordt gemeten: een intensieve kleuring duidt op veel gebonden tracer en dus een lage bestrijdingsmiddelenconcentratie in het monster.

Afhankelijk van het type antilichaam (monoclaal of polyclonaal) is de test meer of minder specifiek. Diverse tests en validatieprocedures tonen aan dat deze ELISA's goed bruikbaar zijn bij de analyse van één component in watermonsters: een negatief resultaat komt steeds overeen met de afwezigheid van de verbinding. Een positief resultaat daarentegen moet bevestigd worden met een tweede onafhankelijke GC- of HPLC-methode om vast te stellen welke verbinding de positieve score veroorzaakte: het onderzochte bestrijdingsmiddel of een verwante verbinding die kruisreactiviteit vertoont.

Een tweede aspect waar rekening mee gehouden moet worden is de invloed van de matrix op de respons van de ELISA, wat vooral van belang is bij kwantitatieve analyses (zie afb. 10).

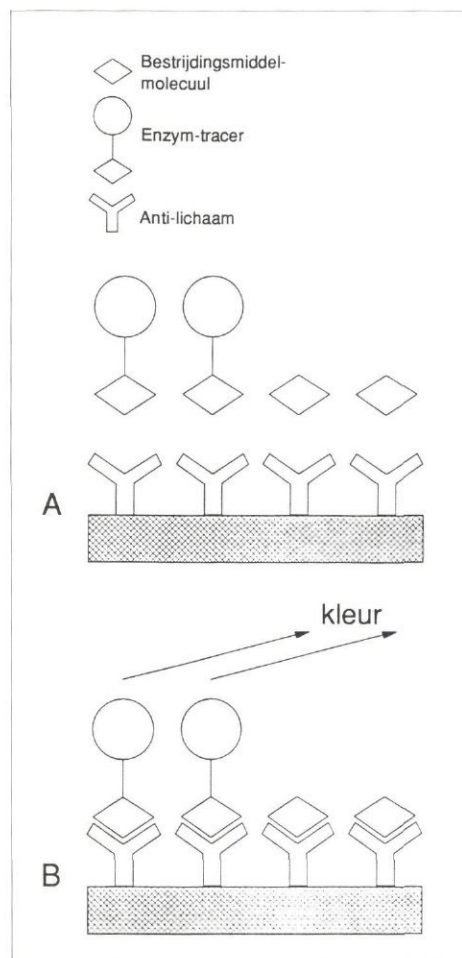
Voor bestrijdingsmiddelenonderzoek is slechts een zeer beperkt aantal ELISA's commercieel beschikbaar met een aantoonbaarheidsgrens lager dan 0,1 µg/l.

Degene die het best onderzocht en het meest toegepast is, is de ELISA voor triazines, die atrazin kan bepalen in concentraties groter dan 0,05 µg/l [Noij en Van Beveren, 1991]. Voor andere triazines is de assay minder gevoelig.

In algemene zin kan gesteld worden dat voor de analyse of screening van één enkele component in water ELISA's zowel kosten- als tijdsbesparend kunnen zijn: zowel in kwantitatieve bepalingen waarbij de aanwezigheid van de verbinding vaststaat en de respons in het bewuste monster bekend is, danwel als voor-screening van een groot aantal monsters om positieve monsters ter bevestiging nader te onderzoeken.

Automatisering

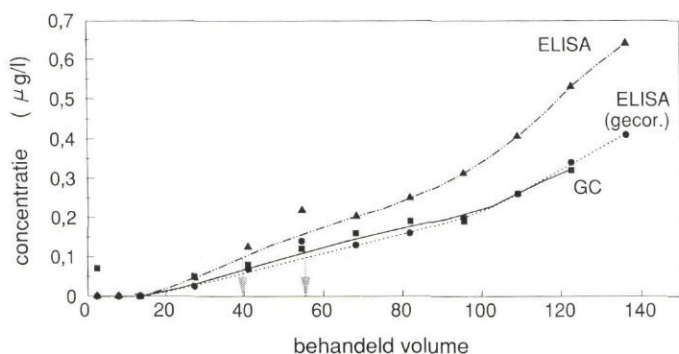
De hoge eisen die aan de analyses en de resultaten gesteld worden heeft ertoe geleid dat de analyseprocedures voor organische microverontreinigingen in water vaak complex en tijdrovend zijn en een zeer nauwgezette handelwijze vereisen. Bovendien worden steeds meer data gegenereerd die niet meer handmatig verwerkt kunnen worden. Hierdoor wordt in de laboratoria in toenemende mate overgegaan op automatisering van de



Afb. 9 - Schematische weergave van het principe van ELISA.

A. een evenwicht stelt zich in tussen de antilichaam-binding met de enzym-tracer en die met het bestrijdingsmiddel;

B. kleurreactie en fotometrische meting van het aan het antilichaam gebonden tracer-enzym.



Afb. 10 - Toepassing van een triazine-ELISA in laboratoriumexperimenten om de adsorptiecapaciteit van actieve koolfiltratie vast te stellen: vergelijking van de resultaten verkregen met gaschromatografie (GC) en ELISA (zonder en met matrix-correctie van de respons). De gecorrigeerde ELISA en de GC resultaten stemmen zeer goed overeen [Noij en Van Beveren, 1991].

analyses en van de verwerking van de resultaten, op onderdelen zoals is weergegeven in tabel IV. Automatisering van de analyse zelf wordt

TABEL IV - Onderdelen van laboratorium-automatisering.

automatische monsterbehandeling
- auto-injectors
- robotica
data-acquisitie en- verwerking
LIMS (laboratorium informatie management systemen)
data-reductie, informatie en presentatie
- chemometrie
expert systemen

al toegepast in diverse laboratoria (zie afb. 11) en ook het gebruik van apparatuur voor data-acquisitie en verwerking is enorm toegenomen. Ook LIMS voor de opslag van onderzoekresultaten, presentatie en het beheren van het werkpakket van het laboratorium is zo langzamerhand

gemeengoed geworden. Waar het echter vaak aan ontbreekt is het omzetten van analyseresultaten naar gemakkelijk toegankelijke en interpreteerbare analytische informatie, de basis voor actie voor de controle en het beheren van de drinkwaterkwaliteit. Hoewel de benodigde gereedschappen in principe beschikbaar zijn (algoritmes en software) is er een grote kloof tussen wat mogelijk is en op universitair niveau ontwikkeld is, en wat ervan in de dagelijkse laboratoriumpraktijk gebruikt wordt. Het dichten van deze kloof is wellicht de belangrijkste uitdaging die door de automatisering aan de laboratoria gesteld wordt en het is de enige weg om te komen tot een beter gebruik van analyseresultaten en een efficiënter gebruik van de analysecapaciteit.

Résumé

De in het voorgaande beschreven technieken en instrumenten hebben voor

de drinkwaterlaboratoria ten doel om te kunnen voldoen aan de nieuwe wensen en eisen die aan de bewaking van de waterkwaliteit gesteld worden. Deze eisen komen neer op het kunnen meten van polaire verbindingen, het kunnen meten op zeer laag concentratieniveau, veelal in een complexe matrix, het leveren van betrouwbare informatie, zowel kwalitatief (identiteit) als kwantitatief (concentratie), het snel kunnen leveren van analyse-resultaten en het uitvoeren van de analyses tegen acceptabele kosten. In het overzicht van tabel V wordt schematisch aangegeven voor welke van deze aspecten de bewuste techniek vooral van belang is.

Noodzakelijke toekomstige ontwikkelingen

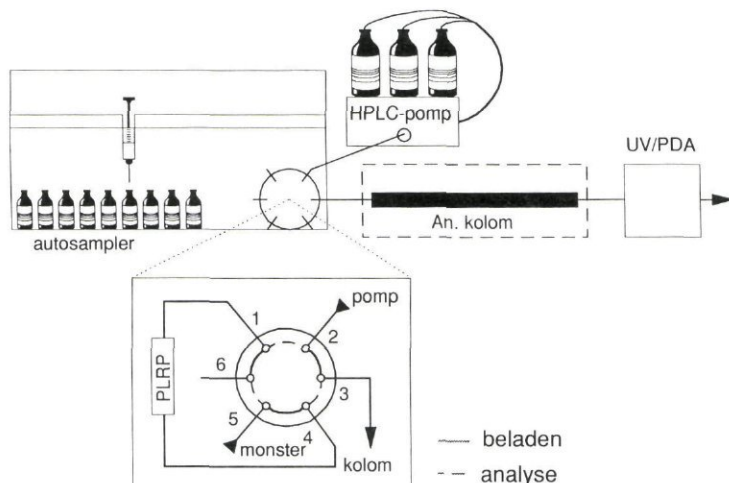
Om de kwaliteit van drinkwater en de daarvoor gebruikte grondstoffen (grondwater, oevergrond- en oppervlaktewater) te kunnen blijven bewaken en het effect van waterbehandelingstechnieken op de waterkwaliteit te kunnen beoordelen is het noodzakelijk dat de laboratoria van de waterleidingbedrijven toegerust zijn met de technieken en instrumenten om de probleemstoffen betrouwbaar te kunnen meten. Dit geldt voor de nu bekende stoffen zoals bestrijdingsmiddelen, polycyclische aromaten en desinfectiebijproducten, maar ook voor nieuwe, nog niet bekende verbindingen die een nadelig effect hebben op de kwaliteit van het drinkwater. Het zwaartepunt bij de verdere ontwikkeling en implementatie van technieken voor de analyse van organische microverontreinigingen in (drink)water zal dan ook liggen bij:

- Chromatografische technieken; niet alleen de scheiding, maar ook monster-voorbewerking en detectie
- Massaspectrometrie; ter bevestiging van doelstoffen, maar ook ter identificatie van onbekende verbindingen
- Chemometrie; voor de (statistisch) verantwoorde verwerking en interpretatie van analyseresultaten.

Binnen deze zwaartepunten zullen de ontwikkelingen de volgende richtingen uitgaan:

1. Uit het oogpunt van kostenreductie, verbetering van de kwantitatieve resultaten, efficiënter gebruik van resultaten en van capaciteit zal een verdergaande automatisering worden doorgevoerd op alle onderdelen van het totale laboratoriumproces.
2. Om die automatisering mogelijk te maken zal in toenemende mate de monstervoorbewerking en analyse in een on-line opstelling gebeuren, gebruikmakend van de koppeling van verschil-

Afb. 11 - Schema van de opstelling voor de volledig geautomatiseerde analyse van fenylureum herbiciden in water: monsterintroductie van 10 ml water met een automatische sampler, concentrering op een PLRP-voorkolom on-line gekoppeld aan een HPLC-instrument met fotodiode-array detectie. Op deze manier kunnen onbewaakt 40 watermonsters geanalyseerd worden gedurende een totale analysesduur van circa 60 uur [Noij en Brandt, 1991].



TABEL V – Overzicht van de gepresenteerde technieken en hun belang voor de drinkwaterlaboratoria.

Doel: techniek:	Polaire verbindingen	Lage concentraties	Betrouwbaarheid	Snelheid	Kostenbesparing
SPE		+		+	+
SFE		+			
µGC			+	+	
SFC	(+)	(+)			
EF	+		+		
C+C	+	+	+	+	(+)
GC/MS		+	+		
HPLC/MS	+	+	+		
PDA	+	+	+		
ELISA	(+)			+	+

(C+C) = gekoppelde chromatografische technieken.

lende analysetechnieken. Vaak zal hierbij miniaturisering nodig en mogelijk zijn.

3. Massaspectrometrie zal in toenemende mate ingezet worden bij het routinematige onderzoek, niet alleen ter bevestiging van de identiteit, maar ook als een universeel toepasbare selectieve detector. HPLC/MS zal zich verder ontwikkelen en eenzelfde status krijgen als GC/MS nu heeft en ingezet kunnen worden voor de identificatie van onbekende verbindingen.

4. Er zullen op grotere schaal immuno assays beschikbaar komen die aan de eisen voor de analyse specifieke verbindingen in drinkwater voldoen. Ook zullen groepspecifieke antilichamen ontwikkeld worden die gebruikt kunnen worden bij de voorscreening voor multi-component analyses met GC of HPLC.

5. Het gebruik van gecompliceerde en duurdere analysesystemen zal leiden tot een verdergaande samenwerking tussen laboratoria waarbij taakverdeling zal leiden tot een zekere mate van specialisme. Om de uitwisselbaarheid en kwaliteit van de resultaten te kunnen garanderen zal laboratorium certificering wijdverbreid zijn.

Literatuur

Brown, M. A. (Ed.) (1990). *Liquid chromatography/ Mass spectrometry ACS symposium series*. American Chemical Society, Washington, DC (USA).

Castledine, J. B., Fell, A.F. Modin, R. and Sellberg, B. (1992). *Assesment of chromatographic peak purity by means of multi-wavelength detection and correlation-based algorithms*. J. Chromatogr., 592, 27-36.

Cramers, C.A. (1986). *Considerations of speed and efficiency in capillary gas chromatography*. HRC&CC, 9, 676-678.

Debets, A. J. J., El Arabi, H, Hupe, K. P., Brinkman, U.A., Hendriks, P. J. M., Claessens, H. A. Everaerts, F. M. and Noij, Th. H. M. (1992). *Electrophoretic sample pretreatment techniques coupled on-line to column liquid chromatography*. The Analyst, 117, 1355-1359.

Frei, R. W. and Zech, K. (Eds.) (1988). *Selective sample handling and detection in high-performance liquid chromatography-part A*. Elsevier, Amsterdam.

Genderen, J. van, en Noij, Th. H. M. (1991). *Organische microverontreinigingen in Rijn, Maas, IJsselmeer en Haringoliet, alsmede in het daaruit bereide drinkwater – een inventarisatie en toxicologische evaluatie*. KIWA-rapport SWO 91.201, KIWA, Nieuwegein.

Genderen, J. van, en Noordsij, A. (1991). *Chemisch-toxicologisch onderzoek voor de drinkwater-*

voorziening. H₂O, 24, 458-463.

Grob, K. (1991). *On-line coupled LC-GC*. Hüthig Buch Verlag, Heidelberg (D).

Hawthorne, S. B. (1990). *Analytical scale supercritical fluid extraction*. Anal. Chem., 62, 633A-642A.

Hendriks, P. J. M., Claessens, H. A., Noij, Th. H. M., Everaerts, F. M. and Cramers, C. A. (1992). *Isotachopheresis as an on-line selective sample pretreatment technique prior to high performance liquid chromatographic analysis*. Chromatographia, 33, 539-545.

ISO (1991). *Water quality-Sampling; ISO 5667-1 tot 5667-4*. ISO, Genève (CH)

Janssen, H. (1992). *Persoonlijke mededeling*. TU Eindhoven.

Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D. (1983). *Capillary Zone Electrophoresis*. Science, 222, 266-272.

Jung, F., Gee, S. J., Harrison, R. O., Goodrow, M. H., Karu, A. E., Braun, A. L., Li, Q. X. and Hammock, B. D. (1989). *Use of immunochemical techniques for the analysis of pesticides*. Pestic.Sci., 26, 303-317.

Knox, J. H. and McCormack, K. A. (1989). *Capillary electrophoresis methods looking into the crystal ball*. J. of Liquid Chrom., 12, 2435-2470.

Leenderts, R. (1991). *Persoonlijke mededeling*. Carlo Erba instruments.

Liska, I., Krupcik, J. en Leclercq, P. A. (1989). *The use of solid sorbents for direct accumulation of organic compounds from water matrices – A review of solid phase extraction techniques*. HRC&CC, 12, 577-590.

Noij, Th. and Beveren, J. van (1991). *Evaluation of an atrazine immuno-assay test for real-life water analysis*. Lezing tijdens: 3rd Workshop on Chemistry and Fate of Modern Pesticides, Bilthoven (NL), September 1991.

Noij, Th. and Brandt, A. (1991). *Analysis of trace concentrations of phenylurea herbicides in water by in-line preconcentration, HPLC-analysis and multiple detection*. Poster gepresenteerd tijdens: HPLC '91, Basel (CH), june 1991.

Noij, Th., Curvers, J. and Cramers, C. (1986). *The effect of column characteristics on the minimum analyte concentration and the minimum detectable amount in capillary gas chromatography*. HRC&CC, 9, 752-759.

Noij, Th. en Spruit, M. (1990). *Bepalingmethode voor Dikegulac in water; KIWA-rapport SWE 90.005*. KIWA, Nieuwegein.

Noordsij, A., Beveren, J. van and Brandt, A. (1983). *Isolation of organic compounds from water for chemical analysis and toxicological testing*. Int. J. Environm. Anal. Chem., 13, 205-217.

Smith, R. M. (Ed.) (1988). *Supercritical Fluid Chromatography*. The Royal Society of Chemistry, Letchworth (GB).

● ● ●

P-eliminatie

• Slot van pagina 321.

7. De specifieke P-release is bij een reasetijd van circa 4 h en een dosering van 15 mg HAc/g z.s. minimaal 7 mg P/g z.s.
8. Het deelstroomproces moet worden gedimensioneerd met de P-balans onder zomerse condities. Als ondergrens lijkt een minimale anaërobe slibfractie van 0,06 noodzakelijk.
9. Bij chemische P-eliminatie is de secundaire slibproductie maximaal 22,5% hoger dan bij de biologische P-eliminatie.
10. De jaarlijkse kosten zijn voor beide P-eliminatietechnieken vrijwel gelijk.

8. Verantwoording

Dit onderzoek is mogelijk gemaakt door een financiële bijdrage van het waterschap De Dommel en de enthousiaste medewerking van het personeel van de rwzi Eindhoven met in het bijzonder Paul Spoor voor de uitstekende project-uitvoering. Daarnaast hebben de stagiairs Maurice Hensen, Edwin Verlangen en Erlinde Vermulst een waardevolle bijdrage geleverd.

Literatuur

1. DHV (1991). *Evaluatie van proefresultaten van biologische fosforverwijdering in de slibstroom in Nederland*. Dossier C1963-01-105, Amersfoort.

2. Kruit, J., Jacobs, L. J. A. M. en Wouda, T. W. M. (1991). *Pilot-plantrearing met vergaande biologische P- en N-eliminatie op de rzzi Eindhoven*. H₂O (24) nr. 8 blz. 198-202.

3. Kruit, J. (1992). *Vergelijking biologische P-eliminatie en chemische P-eliminatie*. Project N- en P-eliminatie rzzi Eindhoven. GTD Oost-Brabant, Boxtel.

4. Levin, G. V. and Sala, U. D. (1987). *Phostriproces a viable answer to eutrophication of lakes and coastal seawaters in Italy*. IAWPRC Conf. Rome, Biological Phosphate Removal from Waste waters, blz. 249-259.

5. Marais, G. R. van et al. (1983). *Review: Observations supporting phosphate removal by biological excess uptake*. Waterresources and Public Health Engineering. University of Cape Town, South Africa.

6. Schönberger, R. and Hegemann, W. (1987). *Biological phosphorus removal with and without sidestream precipitation*. Proceedings IAWPRC Conf. Rome, Biological Phosphate Removal from Waste waters, blz. 165-167.

7. STORA (1985). *Denitrificatie*. Rijswijk.

8. STORA (1988). *Handboek voorkomen en bestrijden van licht-slib*.

9. STORA (1992). *Werking en neveneffecten van simultane defosfatering in actief-slibsystemen*. Rijswijk.

10. STORA (1992). *Chemicaliën voor P- en N-verwijdering, Programma PN-1992*. Rijswijk.

11. Wentzel, M. C. et al. (1985). *Kinetics of biological phosphorus release*. Wat. Sci. Tech. Vol. 17, Paris, blz. 57-71.

12. Witteveen + Bos (1992). *W.s. De Dommel, Strategiestudie aanpassing rzzi Eindhoven*. Boxtel.

● ● ●