

Toepassing van de immunochemie in het waterkwaliteitsonderzoek: immuno-affiniteitschromatografie en ELISA van Triazines in oppervlaktewater

Inleiding

In het kader van de Wet verontreiniging oppervlaktewater heeft het Rijksinstituut voor Integraal Zoetwaterbeheer en Afvalwaterbehandeling RIZA (Lelystad), als technisch-wetenschappelijke dienst van Rijkswaterstaat, een belangrijke taak in het Kwaliteitsonderzoek Rijkswateren. Dit waterkwaliteitsonderzoek is uitgesplitst naar twee functies, de monitoring en de bewaking.

worden. Daarnaast is het belangrijker om te weten of er zich een significant verhoogde verontreiniging van een bepaalde soort verbindingen in het oppervlaktewater bevindt dan specifiek welke verbinding met de daarbij behorende exacte concentratie.

Verontreinigingen in oppervlaktewater kunnen onderverdeeld worden in drie groepen: apolaire, vluchtige en polaire

Samenvatting

Voor de meting van verontreiniging van oppervlaktewater met pesticiden en met name de polaire en toxische triazines werd een methode ontwikkeld, die gebaseerd is op de immunochemie. Door het gebruik van polyclonale antilichamen, enerzijds voor de specifieke isolatie van triazines uit oppervlaktewater met behulp van immuno-affiniteitskolom-chromatografie en anderzijds in een ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay), is het mogelijk om groepsspecifiek triazines te detecteren. De voordelen van deze methode zijn: de snelheid van de bepaling, de lage detectiegrens ($< 0,01 \mu\text{g/l}$), de selectiviteit en de aanzienlijke kostenbesparing in vergelijking met bestaande methoden. Gezien de eigenschappen van een dergelijk isolatie- en detectiesysteem en de dringende noodzaak oppervlaktewater te testen op de aanwezigheid van triazines, lijkt de toepassing hiervan in een continu bewakingssysteem in de nabije toekomst gunstige perspectieven te bieden. Eveneens bestaat de mogelijkheid om, al dan niet na automatisering, de immuno-affiniteitsextractie eventueel gekoppeld aan een degelijk gekarakteriseerde ELISA toe te passen bij de monitoring van de waterkwaliteit op lange termijn.



W. H. MULDER
Rijksinstituut voor
Integraal Zoetwaterbeheer
en Afvalwaterbehandeling



J. A. HOFMAN
Immuno Technology Service
Production BV, Wijchen



P. G. M. STOKS
Rijksinstituut voor
Integraal Zoetwaterbeheer
en Afvalwaterbehandeling



F. M. A. ROSMALEN
Immuno Technology Service
Production BV, Wijchen

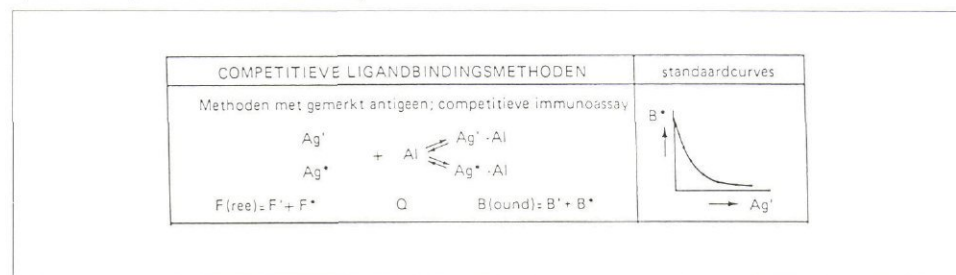
Monitoring kan omschreven worden als het volgen van de ontwikkeling van de waterkwaliteit door het met een bepaalde regelmaat bemonsteren op een groot aantal locaties en het analyseren van een breed spectrum van parameters. In de praktijk worden watermonsters genomen met een frequentie variërend van wekelijks tot maandelijks en centraal geanalyseerd in de specialistische laboratoria van het RIZA. Omdat de resultaten van dergelijke analyses, hoewel zeer geschikt voor lange-termijncontrole, pas na enige tijd beschikbaar zijn, is deze methode niet bruikbaar voor de detectie van kortdurende verontreinigingen of calamiteiten. Deze vragen namelijk om snelle maatregelen, zoals wanneer bijvoorbeeld door een al dan niet bewuste lozing van toxische stoffen de drinkwaterkwaliteit gevaar loopt. Voor de bewaking worden andere eisen gesteld aan de detectie-methoden. Zo is een continue (bijvoorbeeld 24-uurs) bemonstering nodig en een snelle analysemethode, die bij voorbaat op locatie uitgevoerd kan

verbindingen. Wat betreft de apolaire verbindingen bestaat er bij het RIZA al een meetsysteem, dat ± 160 stoffen omvat; het is al geruime tijd operationeel bij grensovergangs-meetstations (Lobith, Eijsden). Een meetsysteem voor vluchtige verbindingen bevindt zich in een vergevorderd teststadium. Op het moment vormt de groep van polaire verbindingen het grootste probleem. Ze zijn vaak zeer toxisch, ze komen in lage concentraties in oppervlaktewater voor, ze zijn hier moeilijk uit te isoleren, hetgeen gevaar oplevert voor de drinkwatervoorziening, en er bestaan nog nauwelijks geschikte analysemethoden voor. Tot deze groep polaire verbindingen behoren o.a. de pesticiden en de maximaal toelaatbare concentratie hiervoor ligt in de orde van $< 0,01 \mu\text{g/l}$ water. De tot nu toe gebruikte methoden om pesticiden te meten zijn bepaalde biologische methoden, GC, HPLC [1-4]. Het nadeel van deze methoden is, dat zij vrij bewerkelijk en duur zijn. Omdat in Nederland voor de meting van pesticiden nog geen gestandaardiseerd

systeem bestaat, is met de ontwikkeling hiervan begonnen en het RIZA heeft zich in eerste instantie gericht op de triazines, waarbij atrazine als testverbinding is gekozen. De reden hiervoor is dat voor de identificatie van atrazine reeds specifieke methoden voorhanden zijn en dat atrazine daadwerkelijk aantoonbaar is in oppervlaktewater in meetbare concentraties. Er is gekozen voor een vrij nieuwe methode, de immunoassay. Deze immunologische methode heeft als voordeel, dat ze snel, niet bewerkelijk, goedkoop, specifiek en gevoelig is.

In een samenwerkingsproject van het RIZA met ITS Production BV is een begin gemaakt met de ontwikkeling van een meetsysteem voor triazines op immunologische basis met als doel dit systeem geschikt te maken zowel voor de bewaking als voor monitoring van de waterkwaliteit op triazine verontreinigingen.

Afb. 1 - Principe van de radioimmunoassay.



Triazines

Triazines, waarvan atrazine en simazine wat betreft gebruik de belangrijkste zijn, zijn gehalogeneerde organische verbindingen en behoren tot de meest gebruikte pesticiden in de land- en tuinbouw. Een groot gedeelte hiervan komt via de bodem in grond- en oppervlaktewater terecht, waar ze door hun oplosbaarheid en toxiciteit een bedreiging vormen voor het milieu en de drinkwatervoorziening. In Nederland bijvoorbeeld ligt het gebruik van atrazine op ca. 150 ton per jaar.

Door het feit, dat Nederland benedenstrooms van de grote rivieren ligt, is het aannemelijk dat ook het gebruik van pesticiden in de ons omringende landen bijdraagt aan de watervervuiling. Illustratief in dit geval is het feit, dat alleen al in Duitsland 17.000 ton aan pesticiden verwerkt worden als bestrijdingsmiddelen [5]. Het moge duidelijk zijn, dat het van belang is zicht te krijgen op de mate van pesticiden-verontreiniging in oppervlaktewater. In de Derde Nota-Waterhuishouding is reeds gesteld, dat om aan de algemene milieukwaliteit te voldoen het gehalte aan atrazine en simazine maximaal 0,1 µg/l respectievelijk 0,4 µg/l mag bedragen. Gezien de chemische eigenschappen van triazines en de eisen, waaraan een – gestandaardiseerd – meetstelsel voor monitoring alsook bewaking moet voldoen, biedt de immunoassay hierin goede toekomstperspectieven. Uit de literatuur blijkt, dat vooral in Amerika de immunoassay van pesticiden zowel in afvalwater alsook in grondmonsters een grote vlucht heeft genomen [6-10].

Immunoassay

Bij organisaties, die zich richten op het gebied van de waterkwaliteitsbeheersing en waterzuivering zijn voornamelijk chemici, toxicologen en biologen werkzaam en voor hen is de immunoassay een nog vrij onbekende meetmethode.

De immunoassay stamt uit de medische diagnostiek. In het begin van deze eeuw ontstond uit een koppeling tussen de chemie en de immunologie een nieuw vakgebied: de immunochemie. De immunologische reactie, die in het lichaam plaatsvindt als het afweersysteem in werking treedt, bleek in de reageerbuis nagebootst te kunnen worden. Het systeem werkt door een koppeling tussen een lichaamsvreemde stof, het antigeen genaamd, en een specifiek daartegen gesynthetiseerd eiwit, het antilichaam. Het gedeelte van het antigeen, dat door

het antilichaam specifiek herkend en gebonden wordt, heet epitoom.

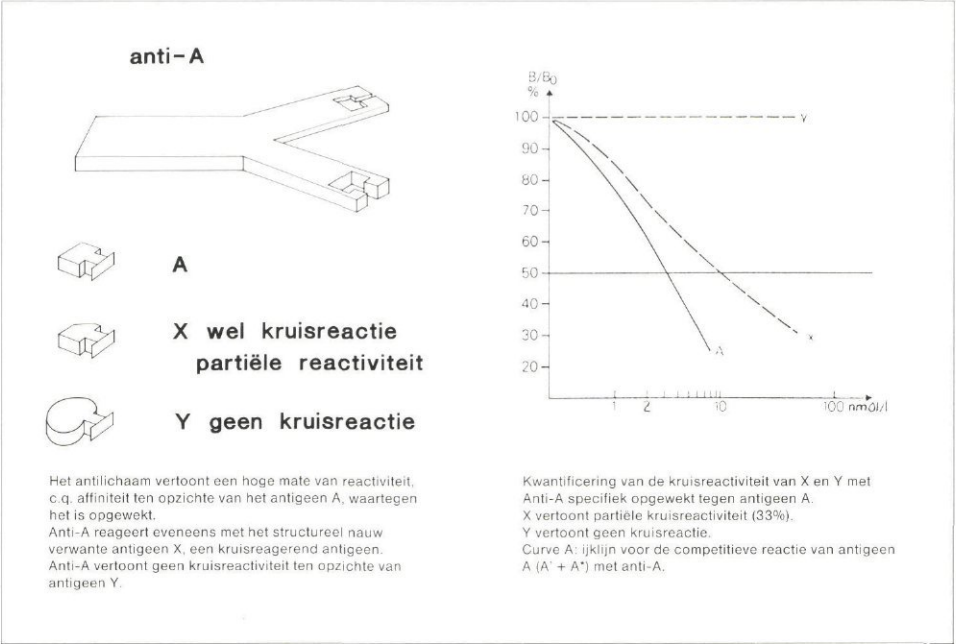
Antigeen

De voorwaarden voor antigenen om het immuunsysteem op gang te brengen zijn:

- 1. ze moeten lichaamsvreemd zijn;
- 2. het molecuulgewicht moet groter zijn dan 5.000 Dalton;
- 3. Ze moeten een driedimensionale structuur bezitten.

Wanneer een antigeen te klein is (Mw < 5000 Dalton) zal het weliswaar door het lichaam onschadelijk gemaakt worden, door macrofagen of lymphocyten, maar geen specifieke antilichaam-reactie opwekken. Deze kleine antigenen worden haptenen genoemd. Om dit probleem te omzeilen worden haptenen doorgaans aan grotere moleculen gekoppeld, de zogenaamde dragers. Wanneer antigenen, of aan dragers gekoppelde haptenen, bij proefdieren worden ingespoten volgens een herhalingschema (de boosterinjecties) zullen na een aantal weken voldoende antilichamen gevormd zijn om te kunnen isoleren voor de immunodiagnostiek. Zoals reeds opgemerkt, wordt een antilichaam gevormd tegen een bepaald epitoom. Grote antigenen of aan dragers gekoppelde haptenen kunnen echter meerdere epitopen bevatten, wat tot gevolg heeft, dat er ook meerdere antilichamen gevormd worden, de zogenaamde polyclonale antilichamen, hetgeen gevolgen zal hebben voor de specificiteit van een antilichaamfractie. Hierop zal nog nader worden ingegaan.

Afb. 2 - Principe van kruisreactiviteitsbepaling.



Bron: Immunochemische analyse in de laboratoriumdiagnostiek, door M. P. van Diejen-Visser, P. J. Brombacher.

Antigeen-antilichaam reactie
De reactie tussen antigeen en antilichaam verloopt in formule als volgt.

$$Ag + Al \xrightleftharpoons[K_d]{K_a} AgAl$$
$$K = \frac{K_a}{K_d} = \frac{AgAl}{Ag \times Al}$$

Waarin:
Ag = antigeen
Al = antilichaam
K_a = affiniteitsconstante
K_d = dissociatieconstante
K = evenwichtsconstante

De evenwichtsconstante ligt bij specifieke antilichamen in de grootte orde van 10⁻¹⁰-10⁻¹³ L/M

Kwantificeringsmethode
Antigenen of haptenen komen doorgaans in zeer kleine hoeveelheden voor. Weliswaar bieden antilichamen de mogelijkheid om deze selectief te binden, maar detectie is niet mogelijk met de conventionele (bio)chemische technieken. In 1959 introduceerden Berson en Yalow [11] de radioimmunoassay (RIA). Het basisprincipe berust op competitie van een onbekende hoeveelheid antigeen met een bekende hoeveelheid gelabeld antigeen voor een beperkte hoeveelheid bindingsplaatsen, antilichaamsconcentratie (zie afb. 1). Kwantificering geschiedde door een scheiding van de gebonden en de vrije fractie, gevolgd door meting van een van deze fracties. Op dit basisprincipe zijn in de loop der tijd verschillende variaties

ontwikkeld. Berson en Yalow gebruikten radioactief jodium als label. Tegenwoordig worden naast radioisotopen (jodium en tritium) ook als label gebruikt: enzymen, lumine-escerende stoffen, fluorescerende stoffen en latex partikels. Een andere variant is de labeling van het antilichaam in plaats van het antigeen. Scheiding van gebonden en vrije fractie kan vergemakkelijkt worden met behulp van een vaste drager systeem. Antigeen of antilichaam wordt in dit geval gekoppeld aan een vaste drager zoals kolommen, microtiter-platen, polystyreen buisjes, etc. Na incubatie van de immunoassay mix kan de vrije fractie gemakkelijk weg-gewassen worden, waarna de gebonden fractie gemeten kan worden.

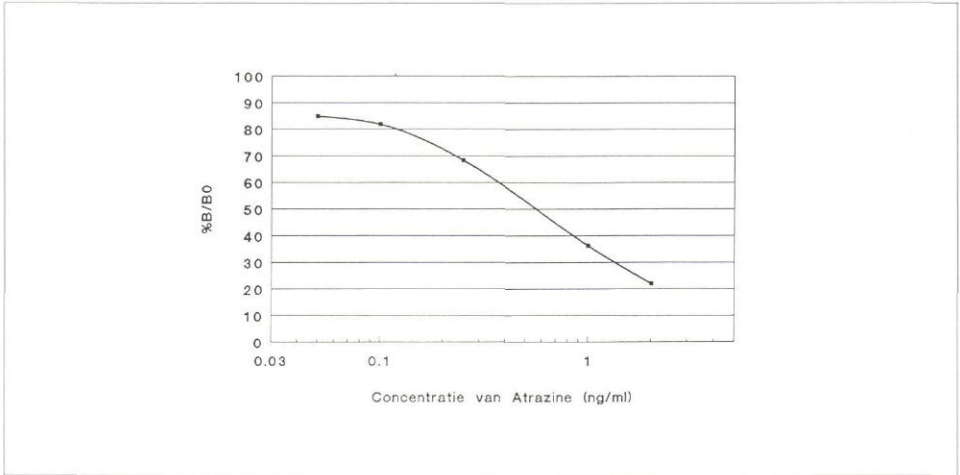
Berekening

Voor de kwantificering van een onbekende hoeveelheid antigeen wordt in de immunoassay meestal gebruik gemaakt van de gebonden fractie. Er wordt een standaard curve gemaakt in een werkbare range van antigeenconcentraties. Het te meten signaal wordt uitgedrukt als B/BO, waarin BO het bindingssignaal is in een antigeenvrij incubatiemengsel en gesteld wordt op 100%. B is het bindingssignaal bij verschillende concentraties antigeen. Onbekende concentraties kunnen aan de hand van %B/BO van deze standaard curve afgelezen worden.

Specificiteit en kruisreactiviteit

Zoals reeds opgemerkt kunnen polyclonale antilichaamsera een heterogene verzameling antilichamen bevatten, afhankelijk van het aantal epitopen op het gebruikte antigeen. Vóór gebruik in een immunoassay zal een polyclonaal antilichaam serum derhalve gekarakteriseerd moeten worden wat betreft de specificiteit, dat wil zeggen de mate waarin datgene gemeten wordt, waarvoor de methode bedoeld is. Inherent aan de bepaling van de specificiteit van een antilichaam serum is het begrip kruisreactiviteit, dat wil zeggen de mate waarin een antilichaam serum ook antigeen verwante verbindingen bindt. Hoe minder kruisreactiviteit, des te specifiek het antilichaam serum.

Kruisreactiviteit van een stof X voor een antilichaam wordt bepaald door het meten van de competitie van X en gelabeld antigeen voor antilichaambindingsplaatsen. In een incubatie-mengsel met een bekende hoeveelheid antilichaam en een bekende hoeveelheid gelabeld antigeen (BO=100%) wordt een oplopende hoeveelheid ongelabeld antigeen of stof X toegevoegd. Door de concentratie van antigeen en stof X, waarbij 50%



Afb. 3 - Standaardcurve van de Atrazine ELISA. (In de afb. is het % B/BO uitgezet tegen de log van de concentratie van de standaarden).

verdringing van de label plaatsvindt, te vergelijken kan de kruisreactiviteit bepaald worden:

% kruisreactiviteit van stof X =
$$\frac{\text{conc. antigeen (B/BO=50\%)}}{\text{conc. stof X (B/BO=50\%)}} \times 100\%$$

In afb. 2 is een voorbeeld gegeven van een kruisreactie experiment.

Nauwkeurigheid, herhaalbaarheid en detectielimiet

Enkele andere parameters, die van belang zijn bij de bepaling van een immunoassay zijn:

- nauwkeurigheid = de mate waarin de gemeten waarde overeenkomt met de werkelijke waarde;
- herhaalbaarheid = de mate van variatie binnen een laboratorium en tussen verschillende laboratoria;
- detectielimiet = de laagste concentratie van het antigeen, die statistisch onderscheiden kan worden van de nulstandaard, meestal uitgedrukt in BO + 3 S.D.

Toepassing van immunoassay bij atrazine meting

Gezien de voordelen en mogelijkheden van de immuno assay in vergelijking met conventionele bepalingsmethoden, is in een samenwerkingsproject van het RIZA met ITS Production BV een immunologische methode ontwikkeld voor de extractie en analyse van triazines in oppervlaktewater, de immuno-affiniteitskolomchromatografie gekoppeld aan de Atrazine-ELISA (Enzym Linked Immuno Sorbent Assay). Bij de ontwikkeling van deze atrazine ELISA is de immunochemie op 2 fronten toegepast: 1. voor de isolatie van atrazine uit water, 2. voor de bepaling van atrazine gehaltenes.

Voor de opzet van een betrouwbare en bruikbare immunologische methode moest aan de volgende voorwaarden voldaan worden:

- specifieke isolatie van atrazine uit oppervlaktewater;
 - lage detectielimiet;
 - hoge specificiteit;
 - goede nauwkeurigheid;
 - goede reproduceerbaarheid;
 - toepasbaarheid in een continu bewakingssysteem.
- Met betrekking tot de specificiteit van een immunologische methode voor triazine-meting moet opgemerkt worden, dat in het geval van een continu bewakingssysteem deze specificiteit vooral gericht moet zijn op triazines als groep van verbindingen. Bij de toepassing in een monitoringssysteem is het veeleer van belang concentraties van afzonderlijke triazines te kunnen meten. Vanuit deze twee opties is het belangrijk een antilichaam terdege te karakteriseren.

Isolatie van atrazine uit water

Voor de specifieke isolatie van atrazine uit oppervlaktewater werd een immuno-affiniteitskolom-chromatografie systeem ontwikkeld. Als kolommateriaal, de drager, werd na verschillende inleidende experimenten voor Reactiegel (Pierce) gekozen. Hieraan werd volgens voorschrift van de fabrikant covalent anti-atrazine antilichaam gebonden. Om optimale kolom condities te verkrijgen moest aan twee voorwaarden worden voldaan. De hoeveelheid antilichaam in verhouding tot de hoeveelheid Reactiegel moest een voldoende capaciteit garanderen om uit 24 uren monsters nagenoeg alle atrazine te isoleren. Daarnaast moest een waterflow ingesteld worden, waarbij het gebonden antilichaam niet van de drager zou spoelen.

Uiteindelijk werd gekozen voor een kolom van 2 ml Reactiegel waaraan gebonden 2 ml antilichaam en een waterflow van 0,1 ml/minuut. De totale capaciteit van een dergelijke kolom bedroeg minimaal 800 ng atrazine, terwijl met genoemde waterflow geen detecteerbare hoeveelheid antilichaam weggespoeld werd. Deze capaciteit garandeert een detectie van triazineverontreinigingen tot zeker 5 µg/l. De volgende stap was de elutie van het met behulp van de kolom geïsoleerde atrazine, teneinde de concentratie te meten met ELISA. Als elutie-vloeistof werd gebruikt: 0,1 N HCl met 5% methanol. Het elutievolume bedroeg 20 ml en geëluëerd werd met een flow van 0,5 ml/minuut. Onder deze condities vond een maximale elutie van het gebonden atrazine plaats, terwijl de binding van het antilichaam aan de drager niet aangetast werd. De stabiliteit van de kolom bleek uit het feit, dat zelfs na 30 cycli van elutie en regenereren de eigenschappen van de kolom onveranderd waren. De efficiëntie van de adsorptie en de elutie van atrazine, de recovery, werd bepaald met behulp van ¹⁴C-gelabeld atrazine. Na beladen van de kolom en elutie onder bovengenoemde condities bedroeg de recovery van ¹⁴C-atrazine 96%.

Atrazine ELISA

Voor de uiteindelijke meting van atrazine gehalten werd gebruik gemaakt van een commercieel verkrijgbare kit (Res-I-Quant Atrazine kit, Immuno Systems Inc., Maine). In deze kit wordt gebruik gemaakt van microtiter platen, waaraan anti-atrazine antilichaam gebonden is. Atrazine gekoppeld aan peroxidase is de tracer en kwantificering van onbekende monsters aan de hand van een standaard curve geschiedt met behulp van H₂O₂ als enzymsubstraat en TMB (tetramethylbenzidine) als kleurreagens. In tabel I is het flowdiagram van de toegepaste ELISA weergegeven. De door de enzymreactie ontwikkelde kleur wordt spectrofotometrisch gemeten bij 450 nm.

TABEL I – Atrazine ELISA Flow diagram.

*	+	80 µl standaard of kolom-eluaat pipetteren in microtiterplaatputjes
*	+	80 µl tracer (enzym conjugaat)
*		incuberen 60 minuten bij kamertemperatuur
*		microtiterplaat leegschudden en wassen
*	+	80 µl substraat (H ₂ O ₂)
*	+	80 µl chromogeen (TMB)
*		incuberen 40 minuten bij kamertemperatuur
*	+	40 µl stop-oplossing (2,5 N H ₂ SO ₄)
*		Absorptiemeting bij een golflengte van 450 nm.

Omdat uit evaluatie experimenten bleek, dat matrix effecten (pH, buffersamenstelling, ionsterkte) de resultaten van atrazine metingen sterk beïnvloeden, werd deze kit zodanig gemodificeerd, dat hij bruikbaar was voor de bepaling van atrazine gehalten in kolomeluaten. Optimale meetcondities werden verkregen met een standaardreeks (0,05–2 µg/l) van atrazine opgelost in een buffer bestaande uit: 0,1 M boraatbuffer, 0,1 M NaCl, 5% methanol, 0,1% BSA, pH 8,4. Een voorbeeld van een standaardcurve is weergegeven in afb. 3. De uit de standaardcurve berekende detectielimiet voor de atrazine ELISA bedroeg 0,05 µg/l atrazine, hetgeen na correctie voor de concentreringsstap tijdens de kolom-extractie resulteert in een uiteindelijke detectielimiet van minder dan 0,01 µg/l atrazine in een watermonster. Omdat kolomeluaten bestonden uit 20 ml 0,1 N HCl + 5% methanol, werden deze alvorens in de ELISA te gebruiken geneutraliseerd met 2 ml 1 N NaOH en gebufferd met 5,5 ml buffer (0,5 M boraatbuffer, 0,5% BSA, 7% methanol, pH 8,4). Hierdoor konden eventuele effecten als gevolg van matrix-verschillen tussen monsters en standaarden uitgesloten worden.

Kruisreactiviteit

In het voor atrazine gekarakteriseerde detectiesysteem werd de kruisreactiviteit getest voor drie veel voorkomende triazines, namelijk simazine, prometryne en terbutylazine. Hiervoor werden deze verbindingen opgelost in Rijnwater tot een concentratie van 1 µg/l. De uiteindelijke concentratie, gemeten als atrazine-equivalenten, bedroeg resp. 0,2 µg/l, 0,5 µg/l en 0,2 µg/l. Hieruit volgt, dat wanneer oppervlaktewater gemeten wordt met het bovenbeschreven systeem, een uitslag van 0,2 µg/l atrazine-equivalenten kan wijzen op een verontreiniging met 0,2 µg/l atrazine, maar ook 1 µg/l simazine of terbutylazine.

Omdat de uiteindelijke waarden de resultaten zijn van twee immuno-chemische bindingsreacties (affiniteitskolom en ELISA), is het beter in dit geval te spreken van een recovery dan van enkelvoudige kruisactiviteit. Uit deze tot nu toe beperkte experimenten kan geconcludeerd worden, dat het detectiesysteem niet specifiek is voor atrazine, maar groepsselectief werkt voor triazines.

Conclusie

Het is mogelijk om een meetsysteem te installeren voor de continue bewaking (24 uur) van oppervlaktewater voor verontreinigingen met triazines.

Het gebruik van immuno-affiniteitskolom-chromatografie gecombineerd met een atrazine-ELISA heeft het voordeel, dat triazineverbindingen gemeten kunnen worden vanaf 0,01 µg/l atrazine-equivalenten. De snelle meetmethode maakt het mogelijk om adequaat te kunnen reageren op calamiteiten. De kosten van dit systeem zijn relatief erg laag en bij het gebruik is een grote mate van deskundigheid niet vereist. Een ander belangrijk voordeel is de mogelijkheid om het systeem geheel of gedeeltelijk te automatiseren.

De beschreven gegevens zijn het resultaat van een reeks inleidende experimenten en op het moment wordt er gewerkt aan een nadere karakterisering van de atrazine ELISA. Het feit, dat deze methode groepsselectief werkt, biedt de mogelijkheid om een breed scala aan triazines, uitgedrukt in atrazine-equivalenten, te detecteren. Na een gesignaleerde verhoging in het water kunnen stroomafwaarts gelegen drinkwaterproducenten snel gewaarschuwd worden en kan vervolgens een nadere identificatie van de verontreinigingen uitgevoerd worden met behulp van specifieke methoden op het centraal laboratorium. Genoemde eigenschappen van de atrazine ELISA maken dit systeem uitermate geschikt voor continue bewaking van de oppervlaktewaterkwaliteit.

De specifieke isolatie van triazines uit oppervlaktewater met behulp van affiniteitskolom-chromatografie is een methode, die eveneens gebruikt kan worden bij de monitoring van de waterkwaliteit. Gekoppeld aan specifieke meetmethoden voor triazines (GC, HPLC of specifieke immunologische methoden) zal dit immunologisch systeem naast een verbetering van de selectiviteit ook aanzienlijk kostenbesparend werken. Er wordt gewerkt aan verdere karakterisering van de gebruikte methoden en materialen.

Literatuur

1. Botterweg, J. e.a. *Bioalarmsystemen: een aanvulling op de traditionele bewaking van de waterkwaliteit*. H₂O (25) 1989, p. 788-794.
2. Ramsteiner, K. e.a. (1974). *Multiresidue method for the determination of triazine herbicides in field-grown agricultural crops, water and soils*. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 57 : 192-201.
3. MMuir, D. C. G. (1980). *Determination of terbutryn and its degradation products in water, sediments, aquatic plants, and fish*. J. Agric. Food Chem. 28 : 714-719.
4. Paschal, D. e.a. (1978). *Determination of atrazine in runoff water by high performance liquid chromatography*. J. Environm. Sci. Health, Part B, 13 : 105-115.
5. Kraus, H. (1989). *Das Problem der Pflanzenschutzmittel in der Trinkwasserversorgung der*

• Slot op pagina 67.

van de N.V. Waterleiding Maatschappij 'Noord-West-Brabant' (WNWB). De kracht van de inzoom-mogelijkheden van HRS blijkt duidelijk uit de resultaten van het Drongelen-onderzoek: zelfs in het geval van intern complexe fluvatieve formaties kan eenduidig gedetailleerde aquifer informatie worden verkregen. De WNWB wint water uit een fluvatiel aquifer op 60 m diepte. Afgaande op putinformatie uit twee andere putten op het terrein leek de watervoerende laag onder het door de WNWB aangekochte perceel uit te wiggen van 18 naar 9 meter dikte. Een dergelijk uitwiggen zou de verdere exploitatieplannen danig doorkruisen; een gericht HRS onderzoek was daarom noodzakelijk om de juistheid van het vermoeden te achterhalen. Er werd besloten tot het schieten van een 400 m lange seismische lijn, langs twee van de putten op het terrein van de WNWB. Omdat met seismische opnemers (hydrofoons) in de putten de verticale reistijd door de ondergrond kan worden gemeten kon een directe correlatie tussen de seismische sectie en de put-informatie worden gemaakt.

Het pakket fluvatieve sedimenten is ter plaatse vrij dik. Pas op een diepte van zo'n 165 m worden de eerste mariene sedimenten aangetroffen. De bewuste watervoerende laag is dus een fluvatiel zand-lichaam.

Om een optimaal beeld te krijgen van de ondergrond in het diepte-interval 30-80 m werden de opnemers vrij dicht bij elkaar geplaatst, op een onderlinge afstand van 2 m. Bovendien werden, om een zo hoog frequent mogelijk signaal te garanderen (wat van prominent belang is in verband met de vereiste verticale resolutie), begraven explosieven van geringe sterkte en begraven hydrofoons (drukmeters, aangebracht onder de grondwaterspiegel) gebruikt. Deze werden aangebracht op dieptes van respectievelijk 5 en 4 m onder maaiveld.

Ook in de processing-fase is speciale aandacht besteed aan het behouden van een zo hoog mogelijke verticale resolutie. Afb. 2 geeft de resulterende sectie tot 90 ms (corresponderend met een diepte van zo'n 80 m).

Bij de vergelijking van de seismische sectie met de boorgat logging gegevens uit de putten bleek dat de metingen van de natuurlijke gammastraling sterke overeenkomst vertoonden met de seismische reflecties. Dit wordt geïllustreerd in afb. 2; iedere plek in de gamma log, duidend op een kleilaag, correspondeert met een reflectie. Een reflectie in de seismische sector duidt dus op een zand-klei-overgang in de ondergrond. Na identificatie in

de seismische sectie van de watervoerende laag (in grijs aangegeven in afb. 2) en de afsluitende kleilagen, kon direct en zonder enige twijfel worden geconcludeerd dat het aquifer niet uitwigt, maar dat het dunner worden in westelijke richting wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van een extra horizontale kleilaag in de kolom. De dikte van de watervoerende laag blijft constant ten westen van put 3.

De reden voor de duidelijke correlatie tussen de kleilagen en de reflecties moet waarschijnlijk gezocht worden in de cyclische wijze waarop de sedimenten zijn afgezet. In de geofysische boorgatmetingen (natuurlijke gamma, zie afb. 2, en elektrische weerstand) kon een zogenaamde normale gradering in het korrelgroottepatroon herkend worden. Grof materiaal werd eerst afgezet, waarna steeds fijner materiaal sedimenteerde. Na een periode zonder sedimentatie, startte een nieuwe sedimentatiecyclus met de afzetting van grof sediment. Het resulterende korrelgroottecontrast is de oorzaak van de sterke reflecties aan deze overgangen: de reflecties kunnen worden gecorreleerd met de bovenkant van de kleilagen.

Ter afsluiting

Het opbouwen van een gedetailleerd beeld van de sedimentaire structuren in de ondergrond geschiedt door het op een effectieve manier geïntegreerd gebruiken van verschillende ingrediënten. Door het lateraal continue beeld dat de HRS sectie van de ondergrond verschaft en de hoge mate van detail hierin – zeker in vergelijking met conventioneel in hydrogeologische studies toegepaste geofysische technieken – vormt ze een zeer waardevolle informatiebron. Hoge Resolutie Seismiek kan daarom bij het oplossen van hydrogeologische problemen, groot- zowel als kleinschalig, van zeer groot nut zijn en het aantal benodigde boringen aanzienlijk terugdringen.

Literatuur

Meekes, J. A. C. en Kemme, M. M. J. *De bodem gedetailleerd in beeld gebracht door toepassing van hoge resolutie seismische technieken*. H₂O (22) 1989 nr. 6 181-184.



Immunochemie

- Slot van pagina 59.

Bundesrepublik. Gewässerschutz, Wasser, Abwasser 106 : 1-16.

6. Ercegovich, C. D. (1971). *Immunological techniques*; In: Pesticide identification at the residue level; Gould, R. F. ed.; Advances in chemistry Vol. 104; Amer. Chem. Soc., Washington DC p. 162-178.

7. Mumma, R. O. en Brady, J. F. (1987). *Immunological assays for agrochemicals*; In: Pesticide Science and Biotechnology; Greenlaigh, R. en Roberts, T. R. eds.; Blackwell Scientific, Londen p. 341-348.
8. Vanderlaan, M. e.a. (1988). *Environmental monitoring by immunoassay*. Environmental Sci. Technol. 22 : 247-254.
9. Knopp, D. e.a. (1989). *Immunoassays. Leistungsfähige Analysenmethoden für die umwelttoxikologische Forschung und Praxis*. Z. gesamte Hyg. 35 : 122-125.
10. Bushway, R. J. e.a. (1988). *Determination of atrazine residues in water and soil by enzyme immunoassay*. Bull.: Environ. Contam. Toxicol. 40 : 647-654.
11. Berson, S. A. en Yalow, R. S. (1959). *Recent studies on insulin-binding antibodies*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 82 : 338-344.



Minister Alders: 'Convenant Delfland alleen van aanvullende betekenis'

Het convenant over de lozing van bestrijdingsmiddelen en afvalstoffen dat het Hoogheemraadschap Delfland en de glastuinbouw in Zuid-Holland willen afsluiten, mag alleen van aanvullende betekenis zijn. Delfland moet conform de wettelijke regels achterstanden wegwerken. Aan gedoogsituaties moet een einde komen.

Minister Alders (milieu) schrijft dit in een brief aan de Zuidhollandse Milieufederatie, die ernstige bezwaren heeft tegen het convenant.

Het convenant heeft tot doel dat de tuinders vrijwillig het gebruik van bestrijdingsmiddelen in de glastuinbouw verminderen. Tegelijkertijd hoeven de individuele bedrijven niet te voldoen aan de Wet verontreinigde oppervlaktewateren (WVO). Alders vindt dat Delfland de lozing van bestrijdingsmiddelen aan banden moet leggen volgens die WVO.

Volgens de Zuidhollandse Milieufederatie verplicht het convenant tot niets anders dan het geven van voorlichting over milieuvriendelijker teeltwijzen.

De federatie is woedend dat Delfland in ruil voor dit convenant voor minstens vijf jaar de WVO in het glastuinbouwgebied buiten werking wil stellen. Samen met de Stichting Natuur en Milieu bereidt de milieufederatie juridische stappen voor tegen Delfland.

De provincie Zuid-Holland heeft vorig jaar november laten weten dat het convenant alleen een voorlopig karakter mag hebben. 'Het mag niet in plaats komen van de vergunningverlening in het kader van de WVO'. (ANP)