

A network diagram consisting of various sized light blue circles connected by thin white lines, set against a solid blue background. The circles vary in size and are scattered across the page, with some larger circles acting as hubs.

Bedrijfstakonderzoek  
BTO 2022.023 | Juli 2022

**Toepassing van LC-  
OCD om organische  
stoffracties in  
drinkwater te  
classificeren en  
kwantificeren**

Joint Research Programme

**KWR**

Bridging Science to Practice

# Rapport

## Toepassing van LC-OCD om organische stoffracties in drinkwater te classificeren en kwantificeren

BTO 2022.023 | Juli 2022

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

### Projectnummer

402045-250

### Projectmanager

Michiel Hootsmans

### Opdrachtgever

BTO – Thematisch onderzoek – Biologische veiligheid  
Evides (aanvullende analyses in tweetal drinkwatermatrixes)

### Auteur

Michiel in 't Zandt

### Kwaliteitsborgers

Paul van der Wielen – KWR

Stefan Huber – DOC-Labor GmbH

### Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

### Keywords

LC-OCD, validatie, fractionering, organisch materiaal, drinkwater, ultrapuur water, watermatrix

Jaar van publicatie  
2022

Meer informatie  
Michiel in 't Zandt  
T +31 (0)30 606 9502  
E michiel.zandt.int@kwrwater.nl

PO Box 1072  
3430 BB Nieuwegein  
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511  
E info@kwrwater.nl  
I www.kwrwater.nl

**KWR**

Juli 2022 ©

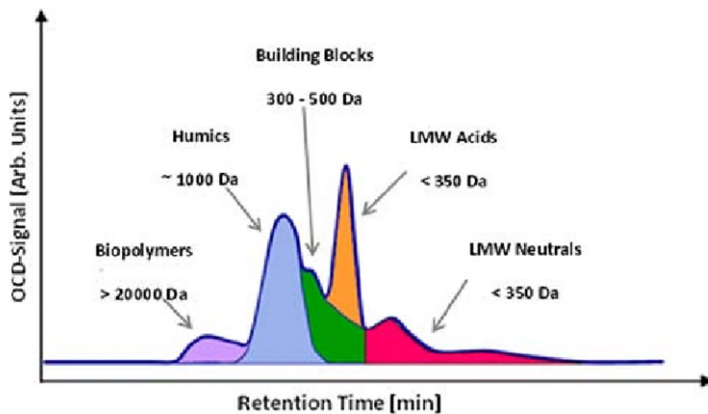
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

# Managementsamenvatting

## Onderzoek naar LC-OCD-methode toont de uitdagingen van het meten van voor drinkwater relevante organische stoffen in drinkwatermatrices

**Auteur** Michiel in 't Zandt

De Liquid Chromatography Organic Carbon Detection of LC-OCD-methode blijkt minder geschikt om biologisch afbreekbare stoffen in drinkwater te detecteren, aangezien hun concentraties vaak onder 10 µg C/l liggen. Wel kan de methode worden toegepast om de verwijdering van organische stoffen door verschillende zuiveringsprocessen vast te stellen, aangezien daar de concentraties biologisch afbreekbare stoffen vaak hoger zijn. Dat zijn de conclusies uit een bureaustudie en een eerste beperkte validatiestudie van de LC-OCD methode binnen het BTO-project "Organische- en deeltjesfracties die biofilmvorming in distributiesystemen veroorzaken en/of tot normoverschrijdingen leiden van *Aeromonas*, *Legionella* en bacteriën van de coligroep". De LC-OCD fractionering van voor drinkwater relevante stoffen komt niet altijd overeen met de classificatie op basis van de molecuuleigenschappen. Stoffen als de biopolymeer laminarine en di- en triprotische organische zuren komen met LC-OCD bijvoorbeeld niet in die categorie terecht. Een volledige validatiestudie met een range van concentraties van relevante stoffen toegevoegd aan drinkwatermatrices is daarom nodig, voordat met zekerheid kan worden vastgesteld of de LC-OCD methode geschikt is voor het kwantificeren van (biologisch afbreekbare) organische stoffen in drinkwater.



Schematisch overzicht van de vijf verschillende LC-OCD fracties

### Belang: In kaart brengen in welke LC-OCD fracties voor drinkwater relevante stoffen terechtkomen

Organisch materiaal is van nature aanwezig in drinkwater en een deel van dit materiaal speelt een belangrijke rol bij microbiële nagroei in het drinkwatersysteem. Deze nagroei is afhankelijk van het type organisch materiaal. Daarom is het van belang om de aanwezige organische stoffen nauwkeurig in kaart te brengen.

LC-OCD (Liquid Chromatography Organic Carbon

Detection) is een veel toegepaste methode om fracties van organisch materiaal te classificeren en kwantificeren op basis van molecuulgrootte. Deze fracties omvatten een grote diversiteit aan stoffen en de precieze samenstelling van de individuele fracties is onvoldoende bekend. Onderzoek moet dieper inzicht geven in de fractionering van voor drinkwater relevante, individuele stoffen en stofgroepen. Dit zal de waarde van de LC-OCD methode voor drinkwateronderzoek vergroten.

### **Aanpak: Bureaustudie en beperkte LC-OCD validatiestudie**

Er is een bureaustudie uitgevoerd naar de LC-OCD-methode om in kaart te brengen in hoeverre de fractionering van voor drinkwater relevante stoffen is onderzocht, als basis voor de aanvullende eerste beperkte validatiestudie van LC-OCD met 13 voor drinkwater relevante stoffen. Deze 13 stoffen zijn toegevoegd aan ultrapuur water, met een eindconcentratie van 100 µg C/l, om de fractionering zonder interfererende watermatrix te onderzoeken. Daarnaast zijn de stoffen toegevoegd aan drinkwater van Tull en 't Waal en Berenplaat met een eindconcentratie van 10 µg C/l om de interactie tussen de stoffen en de watermatrices in kaart te brengen. De verschillende drinkwatertypen met de verschillende toegevoegde stoffen werden vervolgens geanalyseerd met de LC-OCD methode door het DOC-Labor in Karlsruhe, Duitsland.

### **Resultaten: Validatie in ultrapuur water geeft inzicht in fractionering individuele stoffen**

In de praktijk wordt aangenomen dat de fractionering van verschillende stoffen plaatsvindt op basis van de geïdentificeerde LC-OCD categorieën biopolymeren, building blocks, humuszuren, laagmoleculairgewicht zuren en laagmoleculairgewicht neutrale stoffen. Uit de bureaustudie volgde dat diverse voor drinkwater relevante organische stoffen qua stofgroep weliswaar binnen een bepaalde LC-OCD-fractie vallen, maar dat qua molecuuleigenschappen de stoffen in andere LC-OCD-fracties terecht zouden moeten komen. Daarnaast werd duidelijk dat een LC-OCD-validatiestudie van voor drinkwater relevante organische stoffen ontbreekt.

De resultaten van de eerste beperkte validatiestudie in ultrapuur water lieten zien dat de fractionering van de stoffen niet altijd gestuurd worden door de molecuuleigenschappen, waardoor stoffen in andere LC-OCD fracties vallen dan op basis van de molecuuleigenschappen zou worden verwacht. Zo is laminarine bijvoorbeeld een polysaccharide die door algen wordt gemaakt en daardoor als biopolymeer

wordt geclassificeerd. Maar in de LC-OCD analyse valt laminarine in de building block fractie. De complexe grote organische stoffen toonden tevens pieken in de kleinere LC-OCD fracties, wat wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van grotere en kleinere moleculen. Uit de beperkte validatiestudie in de twee drinkwatermatrices bleek dat de toegevoegde concentraties van 10 µg C/l te laag zijn om deze stoffen terug te vinden in de LC-OCD patronen.

### **Toepassing: Vervolgstappen voor validatie fractionering in drinkwatermatrices**

De LC-OCD metingen geven een karakterisering van organische stoffen in water, waarbij de naam van de LC-OCD fractie niet altijd overeen hoeft te komen met de moleculen die in die fractie worden gedetecteerd. Doordat stoffen in concentraties van 10 µg C/l niet konden worden gedetecteerd in drinkwater, lijkt de methode minder geschikt voor detectie van biologisch afbreekbare organische stoffen in drinkwater. Wel kan de methode worden toegepast om de verwijdering van organische stoffen door verschillende zuiveringsprocessen vast te stellen, aangezien daar de biologisch afbreekbare stoffen vaak hoger zijn. De volgende stap is om een volledige validatiestudie uit te voeren waarbij een range van concentraties van relevante stoffen aan diverse drinkwatermatrices worden toegediend, zodat de detectiegrens betrouwbaar wordt vastgesteld en wordt achterhaald wat de invloed van de drinkwatermatrix is op de detectie van de verschillende stoffen. Met een dergelijk gericht onderzoek naar de LC-OCD methode wordt de waarde van de methode om organisch stof in drinkwater te karakteriseren beter duidelijk en kan de methode mogelijk ook worden verbeterd voor toepassing in routinematige analyses van drinkwatermonsters.

### **Rapport**

Dit onderzoek is beschreven in het rapport Toepassing van LC-OCD om organische stoffracties in drinkwater te classificeren en kwantificeren (BTO 2022.023).

# Inhoud

<b>Rapport</b>	<b>1</b>
<b><i>Managementsamenvatting</i></b>	<b>2</b>
<b>Inhoud</b>	<b>4</b>
<b>1 LC-OCD Bureaustudie</b>	<b>6</b>
1.1 Inleiding	6
1.2 LC-OCD analyses van DOC-fracties	7
1.2.1 De LC-OCD fracties in (drink)water	8
1.2.2 Biopolymers (BP) – Fractie 1	10
1.2.3 Humic Substances (HS) – Fractie 2	13
1.2.4 Building Blocks (BB) – Fractie 3	15
1.2.5 Low Molecular Weight Acids (LMWA) – Fractie 4	16
1.2.6 Low Molecular Weight Neutrals (LMWN) – Fractie 5	17
1.2.7 Fracties die indirect met of aanvullend bij LC-OCD analyses worden bepaald	19
1.3 Validatie LC-OCD met bekende organische stoffen	20
1.3.1 Inleiding	20
1.3.2 Validatie biopolymeren (BP) <20.000 Da	21
1.3.3 Validatie mono-, di- en triprotische zuren	22
1.3.4 Validatie aminozuren	22
1.3.5 Niet meegenomen fracties en stoffen	23
1.3.6 Het validatiemedium: gedemineraliseerd water en reverse osmose (RO) water	23
1.4 Conclusies en aanbevelingen	24
1.4.1 Conclusies	24
1.4.2 Aanbeveling	24
<b>2 Validation of LC-OCD with 13 selected compounds in ultrapure and drinking water</b>	<b>25</b>
2.1 Introduction	25
2.2 Materials and methods	25
2.2.1 Selection of compounds	25
2.2.2 Fractionation and peak quantification	26
2.2.3 Water matrices	28
2.2.4 Preparation of solutions	29
2.2.5 Shipment and analysis	29
2.3 Results	30
2.3.1 Measurements in ultrapure water	31
2.3.2 Measurements in drinking water matrices	38
2.4 Discussion	39

2.4.1	Amylopectin and laminarin appear in different LC-OCD fractions	40
2.4.2	Bovine serum albumin (BSA) is a carrier molecule that might interact with NOM	40
2.4.3	Mono-, di- and triprotic acids show lower recovery rates	40
2.4.4	Palmitate and stearate cannot be measured with the LC-OCD method	41
2.4.5	Amino acids and glucosamine	41
2.5	Overall challenges and strengths of the LC-OCD method	42
2.6	Conclusions and Perspectives	42
2.6.1	Conclusions	42
2.6.2	Perspectives	43
<b>3</b>	<b>References</b>	<b>45</b>
<b>I</b>	<b>Bijlagen / appendices</b>	<b>47</b>

# 1 LC-OCD Bureaustudie

## 1.1 Inleiding

Deze bureaustudie richt zich op het karakteriseren van natuurlijk organisch materiaal (NOM) in drinkwater met behulp van de liquid chromatography – organic carbon detection (LC-OCD) methode. LC-OCD is een veel toegepaste methode om NOM te karakteriseren, maar het is nog niet goed bekend welke stoffen in de verschillende fracties vallen. De verschillende fracties bij LC-OCD-analyses zijn gebaseerd op molecuulgrootte en worden standaard ingedeeld als biopolymeren, humuszuren, building blocks, low molecuulair weight neutrals en low molecuulair weight acids. In deze bureaustudie wordt dieper ingegaan op deze fracties en de mogelijke rol van deze verschillende fracties bij microbiële groei in het drinkwaterdistributiesysteem.

In het eerdere BTO-project “Deeltjessamenstelling en biologische stabiliteit - Isolatie en identificatie van organische- en deeltjesfracties gerelateerd aan biologische stabiliteit” dat in 2019/2020 binnen de themagroep Zuivering heeft gelopen, stond het begrijpen van de samenstelling van deeltjes/organische stoffen in het voedingswater (Lekkanaalwater en IJsselmeerwater) centraal (rapportage bijna gereed, zie de [projectbeschrijving](#) voor details). Uit de resultaten van het onderzoek bleek dat de ATP-concentratie aanwezig was in de deeltjesfractie > 0,2 µm en in de LC-OCD fracties biopolymeren en humuszuren werd teruggevonden. Deze ATP in de biopolymeren-en humusfractie is waarschijnlijk extracellulair of vrij ATP. De molecuulgrootte van ATP is 551 Da, waardoor dit vrije ATP alleen in de buildingblockfractie zou vallen, maar ATP werd ook teruggevonden in de biopolymerenfractie, wat de vraag oproept of de scheiding van LC-OCD fracties wel zo zwart/wit is als wordt gesteld.

In brede zin wordt momenteel tevens aangenomen dat alle aanwezige biopolymeren onder de biopolymerenfractie vallen. Er zijn echter een groot aantal biopolymeren bekend die een molecuulgewicht < 20.000 Da hebben, waardoor het aannemelijk is dat deze biopolymeren niet in deze fractie terechtkomen. Voorbeelden hiervan zijn laminarine en peptiden kleiner dan ~180 aminozuren. Eenzelfde situatie speelt bij de humus-fractie en de building blocks-fractie. Aanvullend geldt voor de building blocks-fractie dat de samenstelling gebaseerd is op de aanname dat di- en triprotische zuren in deze fractie vallen. Op deze punten wordt in deze bureaustudie dieper ingegaan.

Voor gezuiverd drinkwater geldt dat de DOC-concentraties over het algemeen veel lager zijn dan die van ongezuiverd oppervlaktewater. Ook leiden de verschillende zuiveringsstappen tot veranderingen in de samenstelling van de verschillende fracties (Baghoth, Dignum, Grefte, Kroesbergen, & Amy, 2009). De effecten van zuiveringsstappen op verwijdering en vorming van LC-OCD-fracties wordt momenteel in een lopend BTO-project bij Zuivering onderzocht. De verschillende LC-OCD-fracties zijn echter nog grotendeels een ‘black box’ omdat de chemische samenstelling niet in kaart is gebracht. Een betere specificatie van de verschillende LC-OCD fracties heeft voor de interpretatie van de resultaten binnen dergelijke onderzoeken een grote meerwaarde.

Het hoofddoel van deze bureaustudie is om in kaart te brengen of bekend is welke, voor drinkwater relevante, individuele stoffen of stofgroepen in de verschillende LC-OCD fracties terechtkomen. In deze bureaustudie wordt daarbij ingegaan op I) fracties en stoffen binnen deze fracties die mogelijk microbiële groei kunnen veroorzaken, met de focus op voor drinkwater interessante en onbekende groepen; II) algemene stoffen die op basis van stof-eigenschappen tot één van de LC-OCD-fractie behoren, maar die qua molecuulgrootte buiten deze fractie vallen. Met deze kennis wordt een beperkte validatiestudie voorgesteld met als doel om de huidige definiëring van de LC-OCD fracties te verbeteren. Dergelijke data kan uiteindelijk gebruikt worden voor een betere definiëring van de verschillende LC-OCD fracties en de mogelijke invloed van verschillende LC-OCD fracties op groei van micro-organismen in drinkwater.

Met deze kennis wordt vervolgens een plan opgesteld om de LC-OCD methode te kunnen valideren. Dit wordt gedaan door afzonderlijk bekende stoffen en stofgroepen te onderzoeken. Dat is één van de vervolgvactiteiten met

een go/no go moment binnen het BTO-project 'Normoverschrijdingen en biofilm' waartoe ook deze bureaustudie behoort.

## 1.2 LC-OCD analyses van DOC-fracties

Bij LC-OCD-analyses wordt de DOC-fractie gescheiden door zogeheten 'size exclusion chromatography' (SEC) (Figuur 1.1). Bij deze methode worden organische moleculen in een oplossing gescheiden op basis van hun molecuulgrootte. De methode is gebaseerd op sterische interacties (interacties die de vorm en reactiviteit van ionen en moleculen beïnvloeden) of fysieke filtering op grootte. Dit wordt in de praktijk gedaan met kolommen met daarin poreuze bolletjes. Onder deze omstandigheden kunnen kleinere moleculen wel de poreuze bolletjes in diffunderen, maar grotere moleculen niet. Daardoor hebben grotere moleculen een snellere en kortere reistijd door de kolom dan kleinere moleculen. De volgorde waarin de organische fracties van de kolom komen en vervolgens geanalyseerd worden, is hierdoor van grote naar kleine moleculen (Figuur 1.1). Een bijeffect van SEC is echter dat hydrofobe organische moleculen adsorberen (vasthechten) aan de kolom, waardoor deze fractie niet meegenomen wordt in de OCD analyse (zie 2.7.3 voor meer detail).

De scheiding van organische moleculen kan ook gedaan worden op ion-interacties (de interactie van de lading van een molecuul met de lading van de kolom) en/of de hydrofobiciteit (de mate van waterafstotendheid) van een molecuul. Voor NOM gaat het in de regel om een zeer diverse fractie die vooral uit hydrofiële stoffen, dus goed in water oplosbare en licht zure (negatief geladen) stoffen bestaat. Doordat naar alle waarschijnlijkheid de grootste NOM-fractie in water qua oplosbaarheid en lading onderling vergelijkbaar is, geeft scheiding op molecuulgrootte in de praktijk dus de hoogste resolutie van verschillende organische-stoffracties.

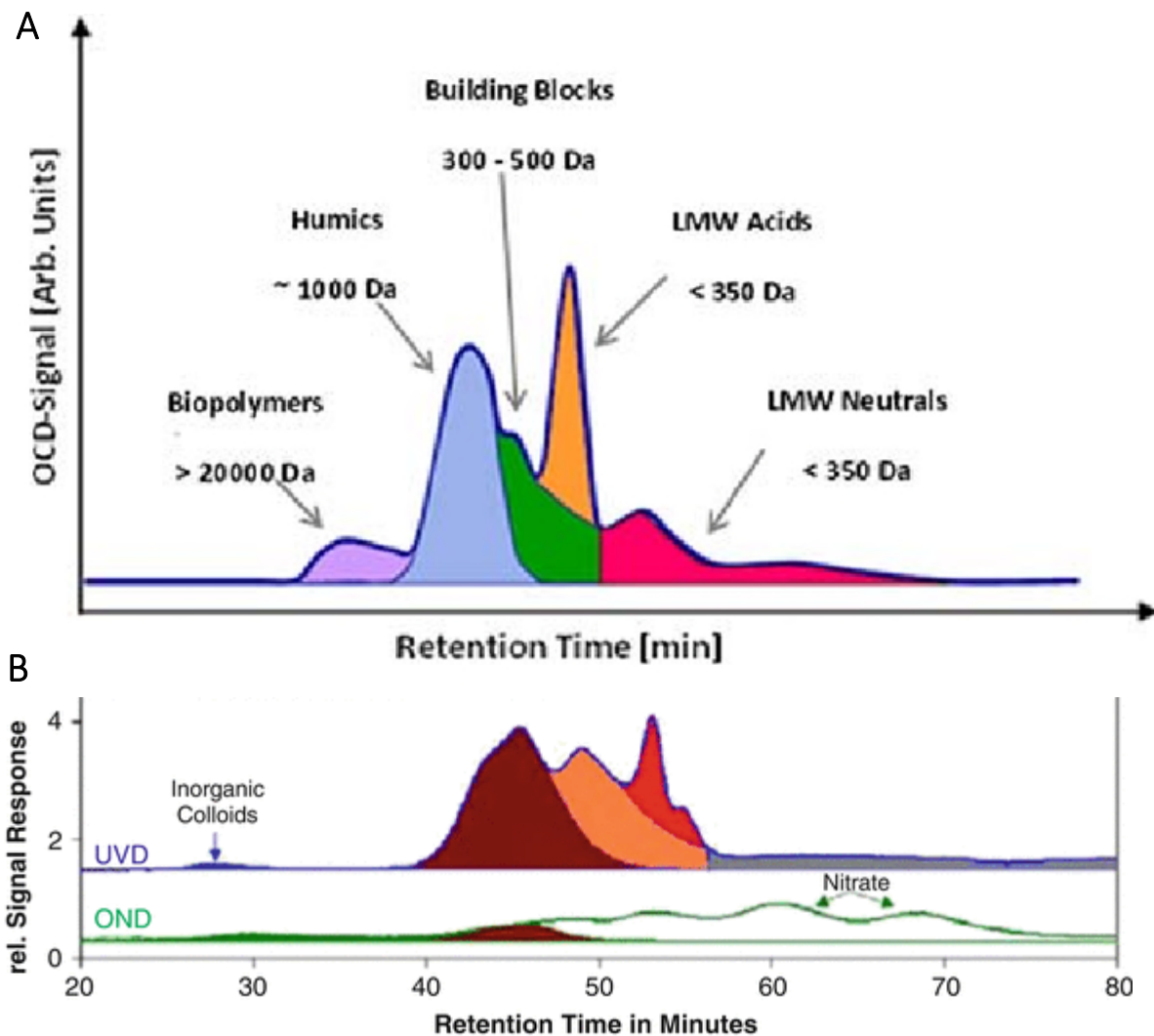
Na de kolomscheiding wordt multidetectie, ofwel de analyse van verschillende fracties, op het organisch koolstof toegepast (OCD) alsmede vaak aanvullend de analyse met UV-absorptie. De analyseerbare LC-OCD fracties van groot naar klein molecuulgewicht zijn: biopolymers (BP), humic substances (HS), building blocks (BB), low molecular weight acids (LMWA) en low molecular weight neutrals (LMWN). De groottes van de verschillende fracties zijn weergegeven in Figuur 1.1 en Tabel 1.1.

Het onderscheid tussen de verschillende fracties die zichtbaar zijn in Figuur 1.1A wordt gemaakt met behulp van de retentietijd en het bekende piekenverloop van individuele fracties (Huber, Balz, Abert, & Pronk, 2011). De linkergrens van de BP-fractie wordt bepaald door de detectielimiet van de SEC-kolom en deze stoffen zijn net hydrofiel genoeg is om van de kolom af te komen. Aan de rechterkant wordt de grens van de BP-fractie gedefinieerd door de linkerhelling van de HS-fractie (zichtbaar in blauw in Figuur 1.1A). De HS-fractie wordt bepaald door middel van een poissonverdeling, een statistische kansverdeling waarmee het voorkomen van HS over de tijd wordt bepaald. De rechterhelling van de HS-fractie bepaalt de grens tussen deze fractie en de BB-fractie. De rechtergrens wordt bepaald door de LMWA-fractie (de oranje piek in Figuur 1.1A).

De linkergrens van de LMWA-fractie wordt bepaald door de rechterhelling van de BB-fractie (het groene oppervlak in Figuur 1.1A). De rechtergrens is gedefinieerd als een verticale lijn op het punt van de maximale kromming van de rechterhelling. Op dit punt begint de LMWN-fractie die duurt tot het signaal onder de bepaalde detectiegrens komt aan het einde van de analysetijd.

De definiëring van de verschillende fracties onderstreept dat deze is gebaseerd op molecuulgrootte. Zoals eerder uitgelicht is het dus waarschijnlijk dat moleculen die qua stoffeigenschappen tot één van de gedefinieerde LC-OCD-fractie horen, maar hier qua molecuulgewicht buiten vallen, tot een andere LC-OCD-fractie zal worden benoemd. In deze bureaustudie wordt daarom per fractie een inschatting gegeven van stoffen die door hun molecuulgewicht waarschijnlijk buiten de eigenlijke LC-OCD-fractie zullen vallen. Deze stoffen vormen een belangrijk onderdeel van de voorgestelde beperkte validatiestudie.





Figuur 1.1 A) Schematisch overzicht van de verschillende LC-OCD fracties van het SEC chromatogram en B) aanvullende analyses voor IC en stikstofcomponenten. Zoals te zien in B) wordt aanvullend met UV-detectie op 254 nm en organic nitrogen detection (OND) ook de hoeveelheid anorganische colloïdale stoffen (Inorganic Colloids; IC) en nitraat en ammonium (niet getoond in bovenstaand voorbeeld, de ammoniumpiek ligt rond de 80 minuten) bepaald. OND-analyse wordt meegenomen in de analyses van het DOC-Labor.

### 1.2.1 De LC-OCD fracties in (drink)water

De data voor de samenstelling van de verschillende fracties in (drink)water is gebaseerd op rapportages en informatie van het DOC-Labor, een laboratorium in Duitsland dat is gespecialiseerd in LC-OCD-analyses, en een BTO-rapportage (BTO 2004.077). Een overzicht van de vijf verschillende fracties is gegeven in Tabel 1.1.

Tabel 1.1 Overzicht van de vijf verschillende fracties die geanalyseerd worden met de LC-OCD methode.

NOM-fractie	Gewicht in Da	Verwachte samenstelling
Biopolymers (BP)	>20.000	Polysachariden, eiwitten, aminosuikers, TEPs, EPS
Humic substances (HS)	~1000 (500-20.000)	Humus- en fulvinezuren
Building blocks (BB)	300-500	Oxidatie- en afbraakproducten van HS, di- en triprotische zuren (kunnen in oplossing twee en drie protonen afgeven)
Low molecular weight neutrals (LMWN)	<350	Mono- en oligosacchariden (ketens van 3-4 monosacchariden), alcoholen, aldehyden, ketonen, aminozuren
Low molecular weight acids (LMWA)	<350	Alle monoprotische zuren (kunnen in oplossing één proton afgeven)

Data afkomstig van het DOC-Labor en FMC Technologies. TEPs: Transparent Exopolymer Particles; EPS: Extracellular Polymeric Substances. De detectielimiet van de verschillende fracties ligt in de µg C/L range.

Zoals te zien is in Tabel 1.1 is de scheiding van de biopolymers (BP) en de humic substances (HS) gebaseerd op molecuulgrootte. De grenswaarde tussen de BP-fractie en de HS-fractie is daarbij 20.000 Da. Vooral voor de biopolymeren geldt echter dat een groot aantal biopolymeren een molecuulgewicht lager dan 20.000 Da hebben en dus naar verwachting niet tot de BP-fractie worden benoemd. Hier wordt in 2.2 en specifiek 2.2.2 op ingegaan. Voor de HS-fractie geldt een beperkte definitie en verwachte samenstelling, waarop in 2.3 dieper wordt ingegaan. Ook hier geldt dat de definitie is gebaseerd op basis van molecuulgewicht (500-20.000 Da). Er wordt ingegaan op HS-bestanddelen die buiten deze fractie kunnen vallen en de mogelijke link met de BB-fractie (2.3.2). Ook wordt in 2.2.2 ingegaan op biopolymeren die mogelijk in de HS-fractie vallen. De BB-fractie, LMWN-fractie en de LMWA-fractie liggen qua gedefinieerd molecuulgewicht dicht bij elkaar. De scheiding tussen de LMWN-fractie en de LMWA-fractie is gebaseerd op de aanname dat monoprotische zuren (dit zijn organische zuren met één zuurgroep zoals bijvoorbeeld acetaat) in de LMWA-fractie vallen, terwijl di- en triprotische zuren (dit zijn organische zuren met twee of drie zuurgroepen, zoals bijvoorbeeld oxaalazijnzuur en citroenzuur) in de BB-fractie worden verwacht, doordat de ionen van de di- en triprotische zuren in een basische omgeving een sterkere negatieve lading hebben dan de ionen van monoprotische zuren.

Deze verwachte fractionering geldt echter niet voor aminozuren. Aminozuren zijn in de regel di- en triprotische zuren en zouden op basis hiervan in de BB-fractie worden verwacht. Op basis van de molecuulgrootte worden aminozuren echter in de LMWN-fractie verwacht. Omdat validatie ontbreekt zijn aminozuren tevens meegenomen in het voorstel voor de eerste beperkte validatiestudie.

Aanvullend geldt, vooral voor de BB-fractie, dat een groot aantal bekende stoffen qua molecuulgewicht buiten de fractie vallen. Hier wordt in 2.4 op ingegaan. Op de LMWA- en LMWN-fractie wordt in 2.5 en 2.6 ingegaan.

Belangrijk om te realiseren is dat I) er grote variaties bestaan in drinkwater dat is bereid uit verschillende soorten water (oppervlaktewater, grondwater) en tevens uit verschillende waterbronnen (lokale effecten) en II) de dominante fracties niet direct een belangrijke rol hoeven te spelen bij microbiële nagroei, terwijl fracties die in zeer lage concentraties aanwezig zijn (waarschijnlijk onder de detectiegrens van de LC-OCD) dat mogelijk wel kunnen. Uit eerdere analyses van verschillende drinkwatermonsters blijkt dat de organische stoffracties in het Nederlands drinkwater vooral bestaat uit HS (60% / ~1000 µg/l, BB en LMWN (tot 15% voor beiden / ~300-600 µg/l) en deeltjesgebonden hydrofoob organisch koolstof (tot ongeveer 5% / ~100-200 µg/l; deze fractie wordt niet gedetecteerd met LC-OCD). Biopolymeren zijn vaak niet detecteerbaar (tot maximaal ~4% / ~100 µg/l) in drinkwater van grondwater of na duinpassage en beslaan dus geen groot deel van het NOM dat in die drinkwatertypen aanwezig is. Echter, BP kunnen juist bij drinkwater dat bereid is uit oppervlaktewater een belangrijke fractie vormen (concentraties tot 80%, metingen tot >20.000 µg/l).

Low molecular weight organic acids zijn in het algemeen in zeer lage concentraties aanwezig (range niet detecteerbaar tot concentraties <1% / ~10-30 µg/l).

### 1.2.2 Biopolymers (BP) – Fractie 1

De categorie biopolymers (BP) bevatten waarschijnlijk polysacchariden, eiwitten, aminosuikers, transparante exopolymeren-deeltjes (TEPs: Transparent Exopolymer Particles) en extracellulaire polymere bestanddelen (EPS: Extracellular Polymeric Substances) (**Fout! Verwijzingsbron niet gevonden.**). Bij LC-OCD analyse wordt de TEP-fractie vaak als colloïdale TEP (cTEP) weergegeven. Dit komt doordat de TEP-fractie in het water aanwezig is als fijnverdeelde planktonische deeltjes die de neiging hebben om samen te klonteren (colloïde-vorming). De BP-fractie wordt soms in de literatuur en rapportering ook de polysaccharide-fractie genoemd, wat voor verwarring kan zorgen.

Vanuit metingen aan verschillende waterbronnen blijkt de fractie belangrijk voor oppervlaktewater en nauwelijks detecteerbaar in grondwater. Vanuit praktijkervaringen voor drinkwaterbereiding uit rivierwater blijkt de BP-fractie bovendien een belangrijke rol te kunnen spelen in microbiële nagroei. Om gericht uitspraken te kunnen doen over de oorzaken van de nagroei, is het van belang de BP-fractie in meer detail in kaart te brengen. In Tabel 1.2 wordt een overzicht gegeven van de verschillende stofgroepen die theoretisch in de BP-fractie vallen.

Tabel 1.2 Overzicht van stofgroepen die theoretisch in de BP-fractie vallen.

Stofgroepen	Samenstelling
Polysacchariden > 20.000 Da	Koolhydraten, lange suikerketens van monosacchariden.
Eiwitten (peptiden) > 20.000 Da	Lange polymere ketens van aminozuren.
Aminosuikers* > 20.000 Da	Suikers waarvan een hydroxylgroep (OH-groep) is vervangen door een aminogroep (NH <sub>2</sub> -groep).
TEPs**	Planktonische zure polysacchariden met een gelachtige consistentie.
EPS	Natuurlijke polymeren van een hoog moleculair gewicht waarbinnen exopolysacchariden (polysacchariden die buiten cellen voorkomen) een grote rol spelen.

\*Aminosuikers vormen een belangrijk onderdeel van bacteriële celwanden, bijvoorbeeld in peptidoglycaan.

\*\*Het planktonische, vrij in water voorkomende karakter van TEPs onderscheidt deze groep van EPS dat voornamelijk gebonden in biofilms wordt aangetroffen.

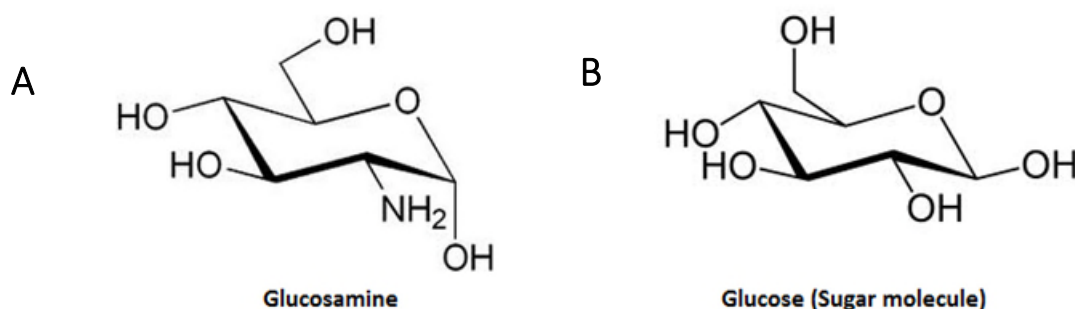
#### Bestanddelen van de biopolymeren-fractie >20.000 Da

*Polysacchariden > 20.000 da* – Voor oppervlaktewater zijn polysacchariden, die door algen en bacteriën worden geproduceerd, relevant. Onderdeel van deze fractie vormen ook de meer tegen biologische afbraak resistente biopolymeren zoals cellulose en lignine. Cellulose en lignine zijn natuurlijke polymeren die bestaan uit honderden, vaak duizenden gelinkte koolstofatomen. Cellulose bestaat uit lange ketens gelinkte glucosemoleculen; de samenstelling van lignine is complexer en bestaat onder andere uit fenolen en diverse dwarsverbindingen tussen de koolstofatomen. In een complexe matrix waar ook eiwitten aanwezig zijn, gaan polysacchariden vaak verschillende niet-covalente (niet-chemische) interacties aan met eiwitten. Afhankelijk van de complexiteit van deze interacties kunnen hieruit ook colloïden (polysaccharide-eiwit-deeltjes) gevormd worden. Wanneer deze colloïden relatief slecht in water oplosbaar zijn, bestaat er een interactie tussen de BP-fractie en de inorganic-colloïdsfractie. Dit kan echter niet met LC-OCD worden vastgesteld, omdat colloïden groter dan 0.45 µm in filterstappen voor de LC-OCD-analyse worden verwijderd. Voor drinkwater geldt dat dergelijke colloïden in de verschillende zuiveringsstappen verwijderd worden.

*Eiwitten > 20.000 Da* – De hoeveelheid eiwitten in de BP-fractie wordt in de praktijk vaak bepaald aan de hand van de hoeveelheid organisch stikstof (in µg N/l) in de fractie én de aanname dat al het organisch stikstof afkomstig is uit eiwitten. Uit de analyse van drinkwatermonsters door het DOC-labor wordt aangenomen dat het percentage eiwitten in de BP-fractie in de regel boven de 20% ligt (DOC-Labor, 2009). Deze aanname is echter niet volledig juist, aangezien stikstof ook voorkomt in DNA- en RNA-moleculen en tevens in aminosuikers en pigmenten als chlorofyl. Er is echter niet bekend hoeveel organisch stikstof gebonden is in niet-eiwitfracties.

Om dit te bepalen, dient de eiwitfractie te worden geïsoleerd. Momenteel wordt in het BTO-project 'Moleculair microbiologische methoden' gekeken naar mogelijkheden voor eiwitisolatie uit drinkwatermonsters. Wanneer een goede isolatiemethode voorhanden is, kan de relatie tussen de hoeveelheid organisch stikstof en de eiwitten namelijk worden bepaald. De grootste uitdaging hierbij is momenteel een voldoende en gerichte isolatie van eiwitten uit drinkwatermonsters. De uiteindelijke kwantificatie van de totale hoeveelheid eiwitten kan met colorimetrische methoden als de Bradford assay en de BCA (Bicinchonic Acid) assay of met directe UV-gebaseerde spectrometrie (bijvoorbeeld met een NanoDrop Uv-Vis spectrofotometer) worden gedaan. Overigens zijn in eerder werk binnen het BTO eiwitten gekwantificeerd in met ultrafiltratie geconcentreerd drinkwater door middel van de Bradford assay (Hijnen et al., 2018).

*Aminosuikers > 20.000 Da* – Aminosuikers zijn suikers waarbij in de suiker-monomeer een hydroxylgroep (-OH) wordt vervangen door een aminogroep (-NH<sub>2</sub>) (de basisstructuur is weergegeven in Figuur 1.2). Aminosuikers vormen een hoofdbestanddeel in de celwand van bacteriën (als bouwstenen van het peptidoglycaan) en schimmels of ongewervelde dieren (chitine). Aminosuikers worden niet door planten geproduceerd en geven daarmee dus een goede maat voor de aanwezigheid van microbiële en ongewervelde dieren populaties (Glaser, Turrión, & Alef, 2004). Wanneer bijvoorbeeld *Asellus* aanwezig is, kan dit leiden tot een verhoogde concentratie van aminosuikers.



*Figuur 1.2 Structuurformule van A) glucosamine en B) glucose. Uit het glucosemolecuul wordt het glucosamine gevormd.*

*TEPs en EPS > 20.000 Da* - Ook vallen TEPs en EPS onder de categorie BP. TEPs vormen vaak een gelachtige consistentie en komen over het algemeen vrij in de waterfractie voor. Ze zijn daarmee onderscheidend van EPS die betrokken zijn bij biofilmvorming en daarom in mindere mate in de waterfractie voorkomen. Het voorkomen van EPS in de waterfractie geeft echter wel de indicatie dat in het bestudeerde systeem waarschijnlijk biofilms aanwezig zijn. Dit is relevant voor onderzoeken naar biofilmvorming. De cTEP fractie wordt in de praktijk gebruikt als maat voor het membraanvervuilingspotentieel (membrane fouling potential). Er geldt bij een cTEP-concentratie van 1-5 µg C/l een laag, bij 5-20 µg C/l een gemiddeld en bij >20 µg C/l een hoog vervuilingspotentieel. Hierbij wordt in de regel aangenomen dat de sub-fractie van de BP-fractie die elueert bij het exclusievolume van de kolom (rond de 26 minuten) vooral uit cTEP bestaat. Dit is echter niet experimenteel vastgesteld.

Een belangrijk doel van deze bureaustudie is om te achterhalen of ook is onderzocht of specifieke polysacchariden, eiwitten en aminosuikers < 20.000 Da in de BP-fractie terechtkomen. Validatiestudies voor individuele stoffen ontbreken echter, waardoor deze informatie niet aanwezig is. Hieronder wordt ingegaan op relevante stoffen.

#### **Biopolymeren met een molecuulgewicht <20.000 Da**

Er bestaat een grote diversiteit aan polysacchariden, eiwitten en aminosuikers die een molecuulmassa kleiner dan 20.000 Da hebben. In theorie vallen deze biopolymeren, doordat in de LC-OCD kolomscheiding op molecuulgrootte plaatsvindt, buiten de BP-fractie. In Tabel 1.3 is een overzicht gegeven van een aantal algemene biopolymeren met een molecuulgrootte < 20.000 Da.

Tabel 1.3 Overzicht van biopolymeren die theoretisch buiten de BP-fractie vallen.

Stofgroepen	Stof	Molecuulgrootte	Verwachte fractie*
Polysachariden	Laminarine***	~5.000 Da	HS
	Chrysolaminarine/Leucosine***	7.750 Da (voor CL2)	HS
Eiwitten	Peptiden (2-50 aminozuren)	220 – 5.500 Da	HS (>500 Da) BB (300-500 Da) LMWN (<350 Da)
	Micropeptiden (< 100-150 aminozuren)	<11,000 – 16.500 Da	HS
Aminosuikers	Sialinezuur***	310 Da	LMWA
	N-acetylglucosamine**/**	221 Da	LMWA

\*De verwachte fractie is gebaseerd op het molecuulgewicht.

\*\*N-acetylglucosamine wordt in de LMWA-fractie verwacht, zie 2.6 voor details.

\*\*\*Voorbeelden van stoffen binnen deze categorie

*Polysachariden < 20.000 Da* – De polysachariden laminarine, chrysolaminarine (ook wel leucosine genoemd) hebben beiden een molecuulgewicht < 20.000 Da. Laminarine is een polysacharide die als koolhydraatreserve in bruinwieren en diatomeeën voorkomt (Becker et al., 2020). Laminarine heeft, afhankelijk van de polymerisatie van het molecuul, een molecuulgewicht van rond de 5.000 Da. Chrysolaminarine, ook wel leucosine genoemd, heeft een vergelijkbare functie als laminarine en wordt door fotosynthetiserende wieren, algen en diatomeeën gebruikt als koolhydraatreserve (Xia et al., 2014). Een voorbeeld van een chrysolaminarine is CL2, een uit de marine diatoom *Odontella aurita* geïsoleerde polysacharide met een molecuulgewicht van 7.750 Da (Xia et al., 2014).

Door de molecuulgrootte van laminarine en chrysolaminarine is de verwachting dat deze stoffen niet in de BP-fractie, maar in de HS-fractie vallen. Dit is echter niet experimenteel vastgesteld. Voor de beperkte validatiestudie wordt daarom voorgesteld om polysachariden < 20.000 Da mee te nemen in de LC-OCD analyses.

*Eiwitten < 20.000 Da* – Ook voor eiwitten geldt dat een grote groep een molecuulgewicht beneden de grens van de BP-fractie heeft. Het gemiddelde molecuulgewicht van een aminozuur is 110 Da. Dit betekent dat eiwitten bestaand uit gemiddeld minder dan 182 aminozuren een molecuulgewicht <20,000 Da kunnen hebben en in theorie dus niet tot de BP-fractie wordt benoemd. Een categorie eiwitten die hiertoe behoort, zijn de micropeptiden die een lengte kleiner dan 100-150 aminozuren hebben. De meeste micropeptiden worden aangetroffen in bacteriën en lijken een belangrijke rol te spelen in de overleving. Er zijn bijvoorbeeld ook veel ribosomale eiwitten die een molecuulgewicht lager dan 20.000 Da hebben. Op basis van de grootte is de verwachting dat micropeptiden in de HS-fractie vallen. Aanvullend geldt dat eiwitten onder natuurlijke omstandigheden worden afgebroken tot peptiden. Peptiden zijn korte eiwitfragmenten met een lengte van twee tot 50 aminozuren. Peptiden hebben een maximaal molecuulgewicht van ca. 5.500 Da en vallen daarmee qua grootte in de HS-fractie. Dit is echter niet experimenteel vastgesteld en daarom wordt voorgesteld om deze peptiden mee te nemen in de beperkte validatiestudie. Voor dipeptiden (2 aminozuren, gemiddeld 220 Da) en tripeptiden (3 aminozuren, gemiddeld 330 Da) is niet bekend onder welke fractie zij vallen. Hier wordt kort op ingegaan bij de LMWA- en LMWN-fractie (1.6 en 1.7).

*Aminosuikers < 20.000 Da* – Voor N-acetylglucosamine, een aminosuiker, is eerder aangegeven dat deze in de LMWA-fractie wordt verwacht, maar ook dit is niet experimenteel vastgesteld. Ook voor sialinezuur, dat onder

andere voorkomt in microalgen en bacteriën, geldt dat het wordt benoemd tot de LMWA-fractie. Ook dit is echter niet experimenteel vastgesteld. Deze stoffen worden momenteel niet meegenomen in de beperkte validatiestudie.

### 1.2.3 Humic Substances (HS) – Fractie 2

Binnen de categorie humic substances (HS) vallen naar verwachting negatief geladen humuszuren en fulvinezuur (Tabel 1.4). Zoals in Figuur 1.1 en Tabel 1.1 is te zien, is de HS-fractie gedefinieerd als humuszuren en fulvinezuur met een molecuulgewicht tussen de 500 en 20.000 Da. Voor humuszuren is echter bekend dat sommige humuszuurmoleculen buiten deze range vallen. Hier wordt onder 2.3.2 op ingegaan.

In de LC-OCD analyse elueert de humuszuur-fractie eerder dan de fulvinezuur-fractie, waardoor een grove onderscheiding van deze twee subfracties mogelijk is (Huber et al., 2011). Beide groepen vormen een belangrijk deel van het organisch materiaal in bodems en sedimenten. Door hun oplosbaarheid in water worden ze ook in oppervlakte- en grondwater aangetroffen. Humuszuren vormen doorgaans de grootste fractie van oppervlaktewater (50-80%, 1000 µg/l of hoger) en grondwater (gemiddeld 25%, ~300 µg/l afhankelijk van de bron van het grondwater) (Lipczynska-Kochany, 2018).

Uit microbiologisch onderzoek is bekend dat humuszuren lastig microbiëel afbreekbaar zijn (Lovley, Coates, Blunt-Harris, Phillips, & Woodward, 1996). In die studie is microbiële groei onderzocht met humuszuren als elektronacceptoren voor micro-organismen uit bodems en sedimenten. Dit wordt bevestigd door eerder onderzoek waaruit blijkt dat deze fractie minder belangrijk lijkt in microbiële nagroei (rapport deeltjessamenstelling 2019/2020, zie de [projectbeschrijving](#) voor details) en uit eerdere groei-experimenten uitgevoerd met drinkwater waaraan humuszuren werden toegevoegd (promotie-onderzoek Eveline Sack, niet gepubliceerd).

Tabel 1.4 Overzicht van de bestanddelen van de HS-fractie.

Bestanddeel	Samenstelling	Voorbeelden/voorkomen	Analysemethoden
Humuszuren	Zeer divers, grote moleculen	Onderdeel van humus, lost op in water	Globale analyse mogelijk met LC-OCD
Fulvinezuur	Zeer divers, grote moleculen	Onderdeel van humus, lost op in water	Globale analyse mogelijk met LC-OCD

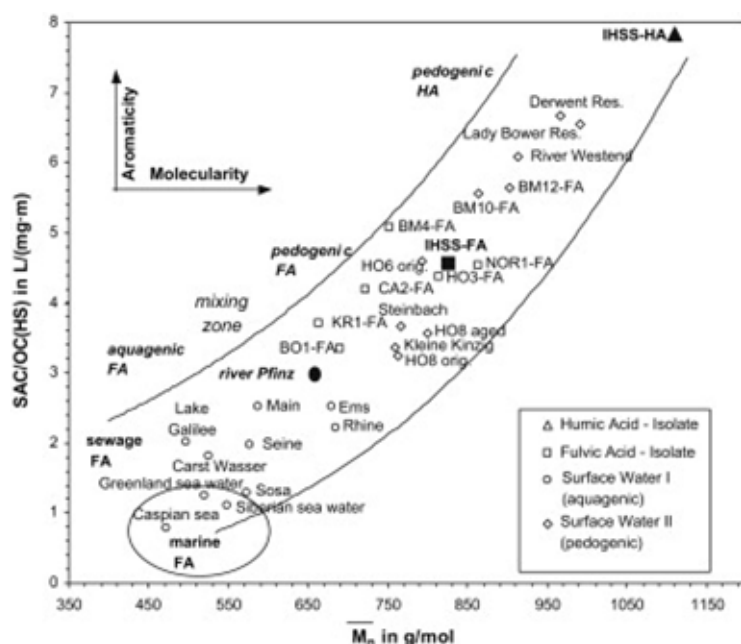
De beperkte rol van HS wordt naar verwachting veroorzaakt doordat de trage microbiologische en abiotische afbraak van HS die in de regel niet op korte termijn (<7 dagen, de maximale verblijftijd in het distributiesysteem) kan worden waargenomen. De relevantie van HS neemt echter toe bij I) verlengde blootstelling door adsorptie en chemische oxidatie onder invloed van ijzer en/of mangaan, en II) een toename in temperatuur (Lovley *et al.*, 1996; Camper, 2004). Vooral voor oppervlaktewater is daardoor de verwachting dat bij hogere temperaturen een grotere fractie HS zal worden afgebroken en naar verwachting worden omgezet in stoffen die binnen de building blocks (BB) vallen. Echter, ook voor drinkwater geldt dus dat hogere temperaturen de afbraak van de aanwezige HS-fractie mogelijk bevorderen. Relevant voor drinkwater waarbij nadesinfectie met chloordioxide wordt toegepast en voor drinkwater dat wordt gedistribueerd met een desinfectieresidu, is om te vermelden dat er een direct verband is tussen de HS-fractie en de vorming van desinfectiebijproducten (DPBs) door de aanwezigheid van chloor (Nikolaou, Golfopoulos, Lekkas, & Kostopoulou, 2004).

#### Gedetailleerde informatie over HS met het HS-diagram

Het HS-diagram wordt standaard meegeleverd bij de LC-OCD analyse van het DOC-Labor (Figuur 1.3). Hierin worden de verschillende monsters als punten in de grafiek weergegeven. De analyse geeft een idee van de verhouding van de aromaticiteit en moleculariteit van de geanalyseerde monsters ten opzichte van de vastgelegde monsters in het HS-diagram. De aromaticiteit, weergegeven op de Y-as, wordt bepaald door de ratio tussen de

Spectral Absorption Coefficient (SAC) bepaald met de UV-absorptie bij 254 nanometer en de OC-waarde voor de HS-fractie. De molariteit, weergegeven op de X-as, is het nominaal gemiddelde molecuulgewicht van de HS-fractie. Zie voor meer achtergrond over de HS-standaarden in de plot de [uitleg van het DOC-Labor](#).

Concreet kan met het HS-diagram worden beoordeeld of een oppervlaktewatermonster zich verhoudt tot de referentiemonsters, of dat de samenstelling sterk verschilt van wat normaal wordt aangetroffen. Het diagram is daarom bedoeld als een vergelijkingstool.



Figuur 1.3 HS-diagram met daarin het verband tussen de aromaticiteit en molariteit (in g/mol) van de HS-fracties. Op de y-as is de ratio tussen SAC en OC gegeven, hetgeen een maat is voor de aromaticiteit van het aanwezige organische materiaal. Op de x-as is de molariteit in g/mol gegeven. In de grafiek staan een groot aantal gemeten referentiepunten voor bijvoorbeeld de Caspië zee (Caspian sea, linksonder) en de rivier de Pfinz (zwarte punt in de grafiek).

### HS <500 en >20.000 Da

Uit de literatuur is bekend dat humuszuren een molecuulgewicht kunnen hebben tussen de 300 en 700.000 Da (Perminova et al., 2003). Op basis van molecuulgrootte zijn er dus humuszuren die niet tot de HS-fractie worden benoemd. Aanvullend geldt dat humuszuren zeer complexe en niet goed gedefinieerde structuren hebben, waardoor scheiding op molecuulgrootte in de praktijk lastig is. In de literatuur wordt daarom ook wel gesproken van een 'apparent molecular weight' ofwel een schijnbaar molecuulgewicht. Bij het schijnbaar molecuulgewicht wordt rekening gehouden met de complexe structuur die de scheiding van humuszuren in SEC beïnvloedt. Er zijn geen validatiestudies beschikbaar voor de fractionering van humuszuren < 500 Da. Algemeen wordt aangenomen dat in de BB-fractie (300-500 Da) gehydrolyseerde humuszuren voorkomen. Aangezien ook intacte humuszuren een molecuulgewicht <500 Da kunnen hebben, is deze aanname echter niet direct te maken. Intacte humuszuren <500 Da kunnen namelijk ook in deze fractie terecht komen. Ook geldt dat kleinere humuszuren (300-350 Da) vanwege het zure karakter in de LMWA-fractie terecht kunnen komen.

Voor humuszuren > 20.000 Da geldt dat deze op basis van molecuulgrootte in de BP-fractie vallen. Door de complexe, niet gedefinieerde samenstelling van humuszuren is validatie hiervan lastig uit te voeren. In de praktijk worden voor de kwantificatie van humuszuren en fulvinezuren de standaarden van de Suwannee River gebruikt (de standaarden IHSS-HA en IHSS-FA, zie rapportages DOC-Labor). Er is bekend dat pieken van deze standaarden buiten de HS-range vallen en in de verschillende andere fracties terecht kunnen komen, al is niet gevalideerd welke stoffen het betreft (Huber et al., 2011). Die resultaten laten dus al zien dat een deel van de natuurlijke aanwezige humus-

en fulvinezuren in oppervlaktewater tot andere LC-OCD-fracties worden benoemd, dan op basis van de eigenschappen verwacht mag worden.

Eerdere studies aan fulvinezuren geven aan dat fracties met een lage moleculaire massa (500-800 Da) en een hoge moleculaire massa (100.000-300.000 Da) voorkomen in sedimenten en oppervlaktewater (Beckett, Jue, & Giddings, 1987; MacFarlane, 1978). Hiervoor geldt tevens dat validatie lastig uit te voeren is, aangezien er geen gefractioneerde standaarden zijn.

#### 1.2.4 Building Blocks (BB) – Fractie 3

Onder de BB-fractie vallen naar verwachting gehydrolyseerde humuszuren en humusbestanddelen met een molecuulgewicht tussen de 300 en 500 Da. Ook wordt aangenomen dat di- en triprotische zuren, dat zijn zuren die respectievelijk twee en drie protonen af kunnen staan (bijvoorbeeld oxaalzuur en citroenzuur), in de BB-fractie terechtkomen (Tabel 1.5). Hiervoor bestaat echter geen direct verband met de molecuulgrootte, zoals wordt toegelicht in 2.4.1. De building blocks (BB)-fractie wordt aangetroffen in de meeste natuurlijke watertypes, zoals oppervlaktewater en drinkwater. In drinkwater maken ze meestal circa 15% uit van het DOC. Een belangrijk verschil voor de definitie van de HS-fractie en de BB-fractie is dat de BB-fractie niet door flocculatie verwijderd kan worden. Dit heeft te maken met de grotere oplosbaarheid van de BB-fractie in water.

Wanneer de resolutie van de SEC wordt verhoogd, kunnen subfracties van de BB zichtbaar gemaakt worden in het piekenprofiel van de chromatogram. Uit dergelijke analyses is door Huber et al. (2011) afgeleid dat deze fractie voornamelijk bestaat uit afbraakproducten van HS. Dit heeft geleid tot de naam 'building blocks' voor deze fractie. Voor drinkwaterzuivering geldt bijvoorbeeld dat de afbraak van de HS-fractie door desinfectiebehandelingen als ozonisatie, UV-behandeling en ultrasonificatie (het gebruik van ultrasoon geluid) kan leiden tot een toename in BB. Er is daarnaast tevens een verband tussen de BB-fractie en de 'low molecular weight acids' (LMWA)-fractie. Door de afbraak van producten in de BB-fractie kunnen namelijk LMWA gevormd worden (DOC-Labor).

Tabel 1.5 Overzicht van de verwachte bestanddelen van de BB-fractie.

Bestanddeel	Verwachte samenstelling
Afbraakproducten van humuszuren en humusbestanddelen	Producten met een molecuulgewicht van 300-500 Da die niet door flocculatie kunnen worden verwijderd
Organische di- en triprotische zuren	Di- en triprotische zuren >300 Da die in oplossing respectievelijk twee en drie protonen af kunnen staan

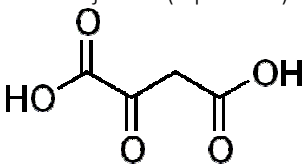
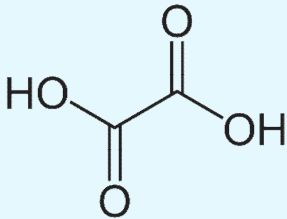
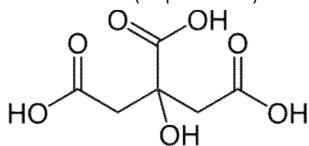
#### Di- en triprotische zuren <300 Da

Voor biologisch relevante di- en triprotische zuren geldt dat deze in het algemeen een molecuulgewicht <300 Da hebben (Tabel 1.6). De aanname dat deze stoffen in de BB-fractie terechtkomen heeft niet te maken met het molecuulgewicht, maar met de sterkere negatieve lading van di- en triprotische zuren in vergelijking met monoprotische zuren. Voor monoprotische zuren (bijvoorbeeld azijnzuur) wordt, door de zwakkere negatieve lading, aangenomen dat deze zuren in de LMWA-fractie vallen. De fractionering van zuren op basis van lading is echter niet experimenteel vastgesteld voor LC-OCD. In de beperkte validatiestudie worden mono- di- en triprotische zuren daarom apart meegenomen.

Verder geldt dat het verband tussen de BB-fractie en LMWA-fractie is gebaseerd op de vorming van monoprotische zuren uit afbraakproducten van de HS-fractie. Echter is bekend dat uit de degradatie van humuszuren ook di- en triprotische zuren gevormd kunnen worden (Almendros, Martín, & González-Vila, 1987).



Tabel 1.6 Voorbeelden van relevante di- en triprotische zuren met een molecuulgewicht &lt;300 Da.

Bestanddeel	Molecuulgewicht in Da
Oxaalazijnzuur (diprotisch): 	132
Oxaalzuur (diprotisch): 	90
Citroenzuur (triprotisch): 	192

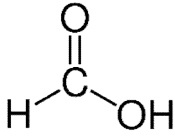
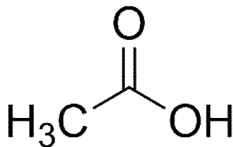
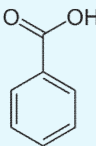
### 1.2.5 Low Molecular Weight Acids (LMWA) – Fractie 4

Onder de 'low molecular weight acids' (LMWA), ook wel 'low molecular weight organic-acids' (LMWOA) genoemd, vallen naar verwachting de alifatische zuren, ofwel de korte-ketenvetzuren van een laag molecuulgewicht (<350 Da) die monoprotisch zijn (geven in oplossing één proton af) (Tabel 1.7). Dit zijn bijvoorbeeld stoffen als azijnzuur en mierenzuur (vaak voornaamste groepen) en tevens melkzuur, propionzuur (ook propaanzuur genoemd) en boterzuur (ook butaanzuur genoemd). In het algemeen geldt dat de kleinere organische zuren in grotere hoeveelheden aanwezig zijn in drinkwatermonsters dan de grotere organische zuren (DOC-Labor), maar ook de LMWA-concentratie in drinkwatermonsters is over het algemeen laag. Dit heeft, zoals eerder aangestipt, niet te maken met de lage relevantie van deze stoffen. Korteketenvetzuren vormen namelijk belangrijke en eenvoudig te gebruiken substraten voor microbiële groei.

Benzoëzuur vormt vanwege de aromatische ringstructuur een speciale stof die in water oplosbaar is. Afgaand op de molecuulstructuur en het molecuulgewicht (122 Da) is benzoëzuur een monoprotisch zuur dat in de LMWA-fractie verwacht wordt. Benzoëzuur wordt in de beperkte validatiestudie meegenomen.

In de LMWA-fractie co-elueert ook een deel van de HS-fractie, zoals te zien is in Figuur 1.1. Hiervoor wordt een correctie toegepast tijdens de integratie van de verschillende pieken. Er geldt dus dat in de praktijk geen goede scheiding kan worden gerealiseerd tussen deze fracties.

Tabel 1.7 Overzicht van de verwachte bestanddelen van de LMWA-fractie.

Bestanddeel	Samenstelling	Voorbeelden/voorkomen
Alifatische zuren	Korte-keten vetzuren met een laag molecuulgewicht (<350 Da)	Mierenzuur (46 Da):  Azijnzuur (60 Da):  En tevens palmitinezuur (C16; 256 Da) en stearinezuur (C18; 284 Da) met een langere C-keten.
	Korte-keten vetzuren met ringstructuur	Benzoëzuur (122 Da): 

*Palmitinezuur en stearinezuur hebben een koolstofketen van respectievelijk 16 en 18 C-atomen*

### Organische zuren >350 Da

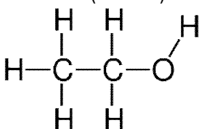
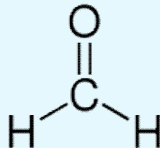
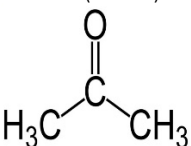
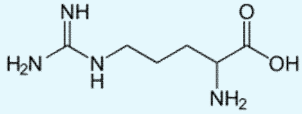
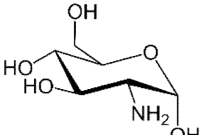
Voor organische zuren met een hoog molecuulgewicht geldt dat deze relatief hydrofoob zijn en dus slecht in water oplossen. Enerzijds is hierdoor de verwachting dat hoogmoleculaire organische zuren beperkt voorkomen in water, anderzijds komen eventuele hoogmoleculaire organische zuren naar verwachting in de HOC-fractie terecht, waardoor ze niet meegenomen worden in de LC-OCD analyse. Een voorbeeld van een zuur met een hoog moleculair gewicht is cerotinezuur (cerotic acid of hexacosanoic acid), een verzadigd vetzuur met een keten van 26 C-atomen en een molecuulgewicht van 396.7 Da. De oplosbaarheid in water is echter verwaarloosbaar. Dit onderstreept de verwachting dat LMWA >350 Da geen belangrijke rol spelen.

### 1.2.6 Low Molecular Weight Neutrals (LMWN) – Fractie 5

Onder de low molecular weight neutrals (LMWN) vallen naar verwachting kleine organische materialen/stoffen (<350 Da) met een lage ionendichtheid. De LMWN-fractie is complex en bestaat zowel uit stoffen die zwak of ongeladen hydrofiel (goed in water oplosbaar) zijn, maar ook licht hydrofobe stoffen (niet goed in wateroplosbaar). In het algemeen geldt dat de fractie wordt gedomineerd door niet/lastig biologisch afbreekbare natuurlijke stoffen, maar ook zeer goed biologisch afbreekbare stoffen worden in deze fractie verwacht. De LMWN-fractie bevat onder andere alcoholen, aldehydes en ketonen (Tabel 1.8). Daarnaast vallen naar verwachting alle aminozuren en ook aminosuikers in deze categorie. Het hydrofobe karakter van de stoffen neemt toe met de retentietijd (bijvoorbeeld pentanol: 120 minuten en octanol: 240 minuten). Een maat binnen LC-OCD analyses is dat stoffen die na 200 minuten elueren als relatief hydrofoob worden gezien.

Voor oppervlaktewater wordt vaak gezien dat er verschillende pieken zijn die met elkaar overlappen. Voor drinkwater geldt dat de fractie eruitziet als een asymptote constante lijn. Dit wordt gezien als een indicatie van de complexe samenstelling van deze fractie in drinkwater, waardoor individuele pieken niet te onderscheiden zijn. Hiermee is geen uitspraak te doen over de samenstelling van de LMWN-fractie. Verder wijst een hobbelig patroon in de LMWN-fractie erop dat er waarschijnlijk biologisch afbreekbare organische materialen aanwezig zijn, maar ook hiervoor bestaat geen concreet bewijs. Het is dus zinvol om in het validatie-experiment te onderzoeken of dergelijke patronen worden waargenomen wanneer een diversiteit aan stoffen, zoals een aminozurenmix, wordt toegevoegd.

Tabel 1.8 Overzicht van de bestanddelen van de LMWN-fractie.

Bestanddeel	Verwachte samenstelling	Voorbeeldstoffen
Alcoholen	Alcoholen tot 350 Da die voldoende tot goed in water oplossen	Ethanol (46 Da): 
Aldehyden	Een stof met functionele –CHO groep en een carbonyl-centrum (een C=O, koolstof met dubbel gebonden zuurstof)	Formaldehyde (30 Da): 
Ketonen	Stoffen met de algemene structuurformule R <sub>2</sub> C=O, waarbij R kan bestaan uit verschillende koolstof zijgroepen	Aceton (58 Da): 
Aminozuren	Een diversiteit aan verschillende aminozuren	Arginine (174 Da): 
Aminosuikers*	Suikers waarvan een hydroxylgroep (OH-groep) is vervangen door een aminogroep (NH <sub>2</sub> -groep)	Glucosamine (179 Da): 

\*Voor aminosuikers geldt dat ze, afhankelijk van het molecuulgewicht, zowel in de BB-fractie als de LMWN-fractie verwacht worden.

Aminozuren kunnen een belangrijke categorie zijn voor microbiële groei in het distributiesysteem. Voor *Aeromonas* is bijvoorbeeld eerder groei aangetoond op arginine (KWR 2016.073). Daarnaast is stam P17 die wordt gebruikt in de AOC-test gespecialiseerd in afbraak van aminozuren. In het algemeen geldt overigens dat microben goed kunnen groeien op aminozuren. Op basis van die aspecten is het daarom goed om de fractionering van aminozuren te valideren. Een recent onderzoek naar de groei van *Aeromonas* laat daarnaast een hoge affiniteit voor lage concentraties aminozuren en vetzuren (onderdeel van de LMWA-fractie) zien (van Bel et al., 2021). Zo was *Aeromonas*-groei te zien op een lage concentratie aminozuren-mix (0.5 µg C/liter). Competitieve groei van *Aeromonas* (groei in aanwezigheid van een diversiteit aan andere bacteriesoorten) verliep veel trager en bij hogere concentraties aminozuren of vetzuren (>5 µg/l), wat aantoont dat aminozuren en vetzuren door een breed scala aan bacteriën wordt gebruikt. Aminozuren en vetzuren zullen daarom ook bij de validatie van de LMWA-fractie worden meegenomen (zie hoofdstuk 3).

Momenteel geldt dat met LC-OCD geen onderscheid kan worden gemaakt tussen aminozuren en andere kleine organische stoffen en is dus de relatieve bijdrage van beiden stofgroepen aan de LMWN-fractie onbekend.

Voor aminozuren heeft tryptofaan de hoogste molecuulmassa (204 Da). Aanvullend bestaat de zijketen van tryptofaan uit een dubbele ringstructuur (een indol). Er is niet bekend of dit invloed heeft op de fractionering met SEC in LC-OCD. Om dit te valideren, wordt daarom tryptofaan specifiek meegenomen in de beperkte validatiestudie.

Voor peptiden >350 Da geldt dat deze naar verwachting door hun lading in de BB-fractie terecht zullen komen.

### Organische neutrals >350 Da

In natuurlijke systemen komen naar verwachting geen organische stoffen voor met een lage ionendichtheid en een molecuulmassa >350 Da. Aanvullend geldt dat LMWN >350 Da zeer slecht tot niet oplosbaar zijn in water, waardoor deze stoffen in de watermatrix geen belangrijke rol zullen spelen.

Wel is er een groot spectrum aan complexere alcoholen, aldehyden en ketonen met een hoger molecuulgewicht die minder goed oplosbaar zijn in water (Tabel 1.9). Aangezien deze stoffen waarschijnlijk niet direct relevant zijn voor drinkwater, worden deze echter niet meegenomen in de validatiestudie.

Tabel 1.9 Voorbeelden van alcoholen (-ol) aldehyden (-on) en ketonen (-al) met 5 en 8 koolstofatomen (5C en 8C).

Voorbeeldstof	Molecuulgewicht	Oplosbaarheid in water
1-pentanol (5C)	88 Da	goed oplosbaar (22 g/l bij 20°C)
2-pentanon (5C)	86 Da	redelijk oplosbaar in water (6% bij 20°C)
Pentanal (5C)	86 Da	Slecht oplosbaar in water
1-octanol (8C)	130 Da	slecht oplosbaar in water (0.3 g/l bij 20°C)
3-octanon (8C)	128 Da	Niet oplosbaar in water
Octanal (8C)	128 Da	Zeer slecht oplosbaar in water

#### 1.2.7 Fracties die indirect met of aanvullend bij LC-OCD analyses worden bepaald

##### Dissolved Organic Carbon (DOC) en de HOC- en CDOC-fracties

Onder dissolved organic carbon (DOC) wordt de totale hoeveelheid opgelost organisch koolstof bedoeld. Met de LC-OCD-methode wordt binnen het DOC vaak nog onderscheid gemaakt tussen 'hydrophobic organic carbon' (HOC) en 'chromatographic DOC' (CDOC). De CDOC wordt verkregen door integratie van het gehele chromatogram en is daarmee een maat voor de totale hoeveelheid geanalyseerd DOC. De verschillende waarden worden berekend met onderstaande formule:

$$\text{DOC} = \text{CDOC} + \text{HOC}$$

HOC wordt gedefinieerd als relatief in water onoplosbare (ofwel apolaire) stoffen en zijn relatief hydrofoob organische moleculen. HOC is wel in het te analyseren watermonster aanwezig, maar tijdens de LC-OCD-analyses adsorbeert deze fractie aan de kolom. De kwantificatie van HOC kan gedaan worden door de DOC van het watermonster en de som van alle LC-OCD pieken te bepalen. De samenstelling van de HOC-fractie is echter onbekend. Alleen het CDOC wordt verder geanalyseerd met LC-OCD. Uit eerdere metingen blijkt dat de HOC-fractie in oppervlakte- en drinkwater meestal ergens rond de 10% (~1000 µg/l) en 4% (130 µg/l in drinkwater bereid uit oppervlaktewater en 40 µg/l in drinkwater bereid uit grondwater) ligt (data van DOC-Labor, 2009 & 2020). Ook blijkt dat na toepassing van actieve-koolfiltratie de HOC-concentratie voor drinkwater onder de detectielimiet van 5 µg/l ligt (DOC-Labor, 2009).

##### Particulate Organic Carbon (POC)

De particulate organic carbon (POC)-fractie kan gezien worden als de fractie organisch koolstof die zeer slecht tot niet oplost in het water. Samen met de CDOC en HOC die hierboven zijn beschreven vormt de POC de total organic carbon (TOC) van een watermonster. De TOC kan berekend worden met de volgende formule:

$$\text{TOC} = \text{CDOC} + (\text{POC} + \text{HOC})$$

De POC-fractie wordt in de praktijk geanalyseerd door het water te filteren over een 0,45 µm membraan en de achtergebleven fractie te analyseren. Deze filtering is een standaardstap in de LC-OCD analyse. Hiermee wordt namelijk het niet-opgeloste koolstof (POC) gefiltreerd van het opgeloste koolstof (DOC). Het DOC (oftewel het overgebleven CDOC en HOC) wordt vervolgens geanalyseerd.

### Inorganic Colloids (IC)

De inorganic colloids (IC)-fractie bestaat, in tegenstelling tot de POC-fractie, uit niet-organische (ofwel anorganische) deeltjes. De IC-fractie wordt doorgaans met UV-detectie gekwantificeerd en omvat anorganisch samenklonterend (colloïdaal) materiaal dat vlak vóór de biopolymeerfractie van de kolom afkomt tijdens de LC-OCD-analyse. De anorganische moleculen van deze fractie zijn dus groter dan de biopolymeren (>> 20.000 Da). De globale analyse van IC wordt vaak apart gerapporteerd in LC-OCD-analyses. Deze fractie bevat silicium dioxide (SiO<sub>2</sub>, in analyses amorf silica genoemd), gehydrateerde ijzer- en aluminiumoxides (zoals bijvoorbeeld ijzer(III)oxide monohydraat: Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) en colloïdaal zwavel (kleine zwaveldeeltjes met een doorsnede van < 1µm). Indien er echter specifieke vragen rondom de samenstelling bestaan, biedt ICP-MS een veel gevoeliger en kwantitatieve detectiemethode.

Er zijn uiteraard ook anorganische stoffen, zoals bijvoorbeeld zouten, die geen IC vormen. Deze opgeloste stoffen worden met de LC-OCD analyse niet gedetecteerd.

## 1.3 Eerste aanzet tot validatie LC-OCD met bekende organische stoffen

### 1.3.1 Inleiding

Vanuit eerder onderzoek en praktijkervaringen lijken vooral de BP-, LMWA- en LMWN-fracties een belangrijke rol te spelen in de microbiële nagroei in het distributiesysteem. Zoals uit hoofdstuk 2 blijkt, bestaan voor deze LC-OCD-fracties een aantal onzekerheden rondom de precieze stofsamenstelling van deze LC-OCD-fracties. Om de waarde van de LC-OCD-fracties in relatie tot het voorspellen van nagroei in het distributiesysteem beter te kunnen bepalen, is het noodzakelijk om beter te weten tot welke LC-OCD-fractie verschillende organische stoffen behoren. Daarbij is het van belang om voornamelijk organische stoffen te testen die een rol spelen bij nagroei in het distributiesysteem. In dit hoofdstuk wordt een voorstel tot een dergelijke eerste aanzet tot een beperkte validatiestudie gedaan. Daarbij worden relevante stoffen meegenomen waarvan wordt aangenomen dat deze in de bovengenoemde fracties vallen. Deze stoffen zijn weergegeven in Tabel 1.10 en in paragrafen 3.2 t/m 3.4 wordt verder toegelicht waarom deze stoffen zijn gekozen.

Tabel 1.10 Overzicht van de te valideren stoffen voor activiteit 5.

Te valideren stof	Stofgroep	Relevantie	Verwachte LC-OCD fractie	Classificatie molecuul
Amylopectine (6 - >50 kDa)	Polysachariden	Hoofdbestanddeel in cyanobacteriën, relevant voor oppervlaktewater	Biopolymers (BP) en humic substances (HS)	Biopolymers (BP)
Laminarine (~5.000 Da)	Polysachariden	Opslag-polysacharide in algen	Humic substances (HS)	Biopolymer (BP)
Albumine* (66.500 Da voor bovine serum albumin)	Eiwitten	Oplosbaar in water, goed beschikbaar	Biopolymers (BP)	Biopolymers (BP)
Oxaalzuur (90 Da)	Diprotische zuren	Goed biologisch afbreekbaar	Building Blocks (BB)	Low molecular weight acids (LMWA)

Oxaalazijnzuur (132 Da)	Diprotische zuren	Goed biologisch afbreekbaar	Building Blocks (BB)	Low molecular weight acids of neutrals (LMWA)
Citroenzuur (192 Da)	Triprotische zuren	Goed biologisch afbreekbaar	Building Blocks (BB)	Low molecular weight acids (LMWA)
Azijnzuur (60 Da)	Monoprotische zuren	Goed biologisch afbreekbaar	Low Molecular Weight Acids (LMWA)	Low molecular weight acids (LMWA)
Benzoaat	Monoprotische zuren	Relatief goed biologisch afbreekbaar, aromatisch molecuul	Low Molecular Weight Acids (LMWA)	Low molecular weight acids (LMWA)
Palmitinezuur (256 Da)	Monoprotische zuren	Algemeen vetzuur, gerelateerd aan <i>Asellus</i> (KWR 2018.013)	Low Molecular Weight Acids (LMWA)	Low molecular weight acids (LMWA)
Stearinezuur (284 Da)	Monoprotische zuren	Algemeen vetzuur, gerelateerd aan <i>Asellus</i> (KWR 2018.013)	Low Molecular Weight Acids (LMWA)	Low molecular weight acids (LMWA)
Aminozuren-mix (~110 Da)	Aminozuren	Door eiwit-afbraak is in natuurlijke systemen een grote diversiteit aan aminozuren beschikbaar	Low Molecular Weight Neutrals (LMWN)	Low molecular weight acids of neutrals (LMWA/LMWN)
Tryptofaan (204 Da)	Aminozuren	Complex aminozuur met indol-zijketen	Low Molecular Weight Neutrals (LMWN)	Low molecular weight acids of neutrals (LMWA/LMWN)
Glucosamine (179 Da)	Aminosuikers klein	Van nature aanwezig in schimmels en bacteriën	Low Molecular Weight Neutrals (LMWN)	Low molecular weight neutrals (LMWN)

*De stofgroep geeft aan tot welke chemische groep de stof behoort. De fractie op basis van de LC-OCD categorie geeft de bij LC-OCD-analyse verwachte fractie weer; de fractie op basis van molecuulgewicht geeft de verwachte fractie op basis hiervan weer. \*Bij het onderzoek aan eiwitten is albumine uitgewerkt, tevens kunnen caseïne en gelatine meegenomen worden.*

*\*\*de kosten voor aanschaf van de benodigde stoffen zijn zeer hoog.*

*\*\*\*in de BP-fractie zijn in het voorstel grote aminosuikers meegenomen om fractionering en detectie te valideren.*

### 1.3.2 Validatie biopolymeren (BP) <20.000 Da

Voor de BP-fractie blijkt uit eerdere LC-OCD analyses dat deze een belangrijke rol speelt bij de drinkwaterbereiding uit oppervlaktewater. Dit heeft naar verwachting te maken met algengroei en bacteriële groei in het oppervlaktewater, waardoor organisch materiaal dat bij LC-OCD analyse onder de BP-fractie valt, toeneemt. Ook is vanuit praktijkervaring bekend dat duidelijke seizoeneffecten zichtbaar zijn op de BP-fractie. Zo is de BP-fractie relatief hoog in de lente, lager in de zomer en het laagst in de winter. De vraag is echter in welke fractie

biopolymeren terechtkomen die qua molecuulgewicht buiten de BP-fractie van de LC-OCD vallen. Hiertoe worden in deze beperkte validatiestudie de biopolymeren glycogeen, laminarine en albumine meegenomen, zodat zowel polysachariden en eiwitten worden gevalideerd.

Voor aminosuikers geldt dat deze zowel in de BB-fractie, HS-fractie als in de LMWN-fractie worden verwacht. Op basis van molecuulgrootte vallen naar verwachting kleine, minder complexe aminosuikers als glucosamine in de LMWN-fractie. Glucosamine komt van nature voor in bacteriën en schimmels, waardoor het naar verwachting een rol kan spelen als substraat voor groei van micro-organismen in het drinkwatersysteem. Glucosamine wordt daarom meegenomen in de beperkte validatiestudie. Grotere, complexere aminosuikers als glucosaminoglycaan en hyaluronzuur worden verwacht in de HS- of BP-fractie. Dit is echter niet gevalideerd. Door de hoge kosten voor aanschaf van deze complexe aminosuikers en de verwachting dat deze stoffen niet direct relevant zijn in drinkwater, is besloten om deze stoffen niet mee te nemen in de validatiestudie.

### 1.3.3 Validatie mono-, di- en triprotische zuren

Organische zuren zijn in het algemeen goede voedingsstoffen voor microbiële groei. Het voorstel is daarom om monoprotische zuren en de di- en triprotische zuren ook te valideren. Validatie van deze stoffen met LC-OCD fractionering is tevens relevant omdat verondersteld wordt dat de LC-OCD-fractionering plaatsvindt op basis van de lading van de verschillende zuren. Er geldt namelijk dat diprotische en triprotische zuren sterker negatief geladen zijn dan monoprotische zuren. Op basis van de negatieve lading worden de monoprotische zuren in de LMWA-fractie verwacht, terwijl de di- en triprotische zuren in de BB-fractie worden verwacht. Met de huidige opzet van de beperkte validatiestudie waarin azijnzuur (monoprotisch zuur), oxaalzuur en oxaalazijnzuur (diprotische zuren) en citroenzuur (triprotisch zuur) worden meegenomen, kan dit worden geverifieerd. Deze stoffen vormen centrale stoffen in het microbiële metabolisme en zijn daarmee relevant in de context van biologische stabiliteit.

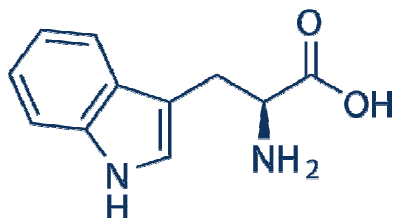
### 1.3.4 Validatie aminozuren

Aminozuren vormen een belangrijke koolstof- en stikstofbron voor micro-organismen. Aminozuren zijn polyprotisch en staan in oplossing meer dan één proton af. Het verschil met polyprotische organische zuren is echter dat bij de aminozuren één proton kan worden afgestaan door de carboxylgroep van het aminozuur (R-COOH) en de overige protonen door de aanwezige aminogroepen (R-NH<sub>2</sub>) en hydroxylgroepen (R-OH). Aminozuren die de meeste protonen af kunnen staan zijn triprotisch (arginine, lysine, aspartate, glutamate, tyrosine, en histidine). In deze beperkte validatiestudie is het voorstel om een mengsel van aminozuren toe te voegen, aangezien dit in de praktijk bij eiwitafbraak wordt gevormd. Indien uit deze validatie blijkt dat aminozuren in verschillende LC-OCD-fracties vallen, dan kan in het vervolg gekozen worden om de aminozuren onder te verdelen op basis van hun chemische eigenschap (apolair, polair, zuur en basisch) (Tabel 1.11). Deze eigenschappen zouden namelijk effect kunnen hebben bij de size-exclusion chromatography (SEC) van de LC-OCD-analyse.

**Tabel 1.11** Overzicht van de vier groepen aminozuren gebaseerd op de zijketens. Op basis van de zijketens zijn aminozuren onderverdeeld in hydrofoob (relatief slecht oplosbaar in water), hydrofiel (goed oplosbaar in water), negatief geladen en positief geladen. Bron: *An Introduction to Nutrition v1.0*

Group	Characteristics	Name	Example (-Rx)
non-polar	hydrophobic	Ala, Val, Leu, Ile, Pro, Phe, Trp, Met	 Leu
polar	hydrophilic (non-charged)	Gly, Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Gln	 Leu
acidic	negatively charged	Asp, Glu	 Asp
basic	positively charged	Lys, Arg, His	 Lys

Om alvast een eerste inzicht te krijgen in de fractionering van complexere aminozuren, is in de validatie het aminozuur tryptofaan apart opgenomen. Tryptofaan is een triprotisch aminozuur met een indol-zijketen (Figuur 1.4).



Figuur 1.4 Structuurformule van tryptofaan.

### 1.3.5 Niet meegenomen fracties en stoffen

Het TEP speelt een belangrijke rol in de vervuiling van reverse osmose (RO)- en ultrafiltratie (UF)-membranen en is dus in die context relevant. TEP zijn waarschijnlijk een mix van biopolymeren, maar de chemische samenstelling van TEP is onbekend is. Hierdoor is het niet mogelijk om TEP te valideren met de LC-OCD en daarom is TEP niet meegenomen als organische stof in het voorstel voor de validatiestudie.

Voor humuszuren en fulvinezuur is aan de hand van standaarden van de International Humic Substances Society (IHSS) voor humuszuren (IHSS-HA) en fulvinezuren (IHSS-FA) de fractionering met de LC-OCD methode gevalideerd (Huber et al., 2011). Hieruit blijkt dat de standaarden stoffen bevatten die binnen de andere vier fracties van de LC-OCD vallen. Daarom is besloten om humus- en fulvinezuren niet opnieuw te valideren. Eventueel kan echter wel, indien verdere validatie van humuszuren en fulvinezuren gewenst is, een fractionering op basis van molecuulgrootte, parallelle LC-OCD analyse en karakterisering van molecuulsamenstelling met LC-MS worden uitgevoerd. Vooralsnog is deze validatie echter niet opgenomen in de voorgestelde validatiestudie.

In de LMWN-fractie vallen tevens alcoholen, aldehyden en ketonen. Er zijn echter geen directe aanwijzingen dat deze stoffen relevant zijn voor drinkwater zonder een desinfectieresidu. Deze stoffen worden daarom niet meegenomen in de voorgestelde validatiestudie.

### 1.3.6 Het validatiemedium: gedemineraliseerd water en reverse osmose (RO) water

De beperkte validatiestudie van de LC-OCD zal worden uitgevoerd in een van tevoren geselecteerd watermedium. Hierbij kan gekozen worden voor MilliQ-water, dat gedemineraliseerd water is waarin de DOC-concentratie en ionen-/zoutenconcentratie verwaarloosbaar laag zijn. De definitie van MilliQ-water is water met een weerstand van 18.2 megaohm (M $\Omega$ )/cm. De hoge weerstand is hierbij een maat voor de zeer lage concentratie opgeloste stoffen en ionen. RO-water is vergelijkbaar met MilliQ-water en wordt bereid op basis van RO-membraanfiltratie. In vergelijking is RO-water, afhankelijk van de gekozen opstelling 90-99% puur, wat minder zuiver is dan MilliQ.

Het voordeel van het gebruik van MilliQ- of RO-water voor de LC-OCD validatiestudie is dat met grote zekerheid kan worden vastgesteld in welke fractie de onderzochte stoffen vallen. Mogelijke dubbele pieken vallen namelijk met zekerheid toe te wijzen aan één enkele stof, omdat de analyse niet wordt verstoord door organische stoffen die in het water aanwezig zijn. Een nadeel van RO gezuiverd water is dat eventuele interacties tussen verschillende organische stoffen niet meegenomen worden (zie 1.11). Deze interacties betreffen bindingen tussen verschillende organische stoffen waardoor de interactie met de scheidingskolom verandert alsmede bindingen tussen stoffen waardoor de oplosbaarheid verandert en bijvoorbeeld coagulatie kan optreden.

Het voorstel is daarom om voor de beperkte validatiestudie met individuele stoffen en stofgroepen MilliQ te



gebruiken. Daarbij zal ook MilliQ-water waaraan geen stoffen zijn toegevoegd, worden meegenomen als negatieve controle.

## 1.4 Conclusies en aanbevelingen

### 1.4.1 Conclusies

- De fractionering van organisch materiaal met LC-OCD is momenteel gebaseerd op de molecuulgrootte van de organische stoffen. Uit eerdere onderzoeken volgt dat de scheiding van NOM op basis van molecuulgrootte niet zo zwart/wit in de benoemde LC-OCD fracties kan worden ingedeeld als wordt gesteld.
- Er bestaan een groot aantal voor drinkwater relevante stoffen die op basis van stoffeigenschappen tot één van de LC-OCD-fractie behoren, maar die qua molecuulgrootte buiten deze fractie vallen. Validatie van de fractionering van deze stoffen ontbreekt.
- De BP-fractie speelt vooral een belangrijke rol in oppervlaktewater en drinkwater bereid uit oppervlaktewater. Validatie voor de fractionering van specifieke polysachariden, eiwitten en aminosuikers die buiten de range van de BP-fractie vallen (< 20.000 Da) ontbreekt.
- Onder de BB-fractie vallen naar verwachting gehydrolyseerde humuszuren en humusbestanddelen (300 -500 Da). Ook di- en triprotische zuren worden op basis van lading in deze fractie verwacht, maar ook hiervoor ontbreekt een validatie.
- De LMWA- en LMWN-fracties overlappen in de range voor molecuulgewicht (<350 Da), waardoor scheiding is gebaseerd op stoffeigenschappen als lading (monoprotische zuren in LMWA-fractie, neutrals in LMWN-fractie). Een betere definitie van deze fracties is zeer gewenst, aangezien stoffen die tot deze fracties worden toegewezen waarschijnlijk een belangrijke rol in de biologische stabiliteit van water spelen.

### 1.4.2 Aanbeveling

De aanbeveling is om een eerste aanzet tot validatie van LC-OCD in Milli-Q water uit te voeren met de in hoofdstuk 3 genoemde 13 stoffen en stofgroepen. De selectie biedt een breed overzicht van stoffen die relevant zijn in drinkwater. De geselecteerde stoffen en stofgroepen beslaan de BP-fractie, de BB-fractie, de LMWN-fractie en de LMWA-fractie. De HS-fractie is niet meegenomen, aangezien hier eerder validatiestudies op zijn uitgevoerd.

## 2 First step in validation of LC-OCD with 13 selected compounds in ultrapure and drinking water

### 2.1 Introduction

Liquid Chromatography coupled to Organic Carbon Detection, or LC-OCD, is a frequently used method for the characterization of natural organic matter (NOM) in surface and drinking water. Since quantity and types of organic matter significantly determine biological stability and microbial growth in drinking water systems, characterisation of organic matter composition and concentration in water are necessary to control or improve microbial water quality.

The literature study presented in chapter 1 highlighted the need for additional knowledge into the fractionation of known organic compounds. Chapter 1 gives a detailed description of the LC-OCD method and showed that current application of LC-OCD results in an absorbance spectrum, which is used to divide the NOM in five individual fractions that are defined from larger molecular size to smaller molecular size. These five fractions are defined as the biopolymers (BP), humics or humic substances (HS), building blocks (BB), low molecular weight acids (LMWA) and low molecular weight neutrals (LMWN) (Figure 2.1). However, these fractionation patterns are mainly based on assumptions about the properties or molecular weight of the organic compounds and this approach has to our knowledge not been validated with single organic compounds. Therefore, in this study, we investigated the fractionation of 13 single and known organic compounds that are relevant in drinking water production and distribution. The study aims at performing a first step in validating this current LC-OCD procedure by unravelling I) the fractionation of 13 individual organic compounds in ultrapure water with LC-OCD and II) the interaction of the 13 individual compounds with two drinking water types that contain different NOM composition and concentration to discover possible interfering effects of NOM-fractions in the drinking water matrix.

### 2.2 Materials and methods

#### 2.2.1 Selection of compounds

A selection of 13 compounds was made based on their relevance in drinking water production and distribution (Table 2.1). For details on the selection of these 13 compounds, see the above literature study of activity 1 “LC-OCD beknopt rapport”. BP: Biopolymers; HS: Humics / Humic Substances; BB: Building Blocks; LMWA: Low Molecular Weight Acids; LMWN: Low Molecular Weight Neutrals. Table 2.1 shows in which LC-OCD fraction a compound is expected to occur and how the compound has been classified in the past, based on the characteristics of the molecule.

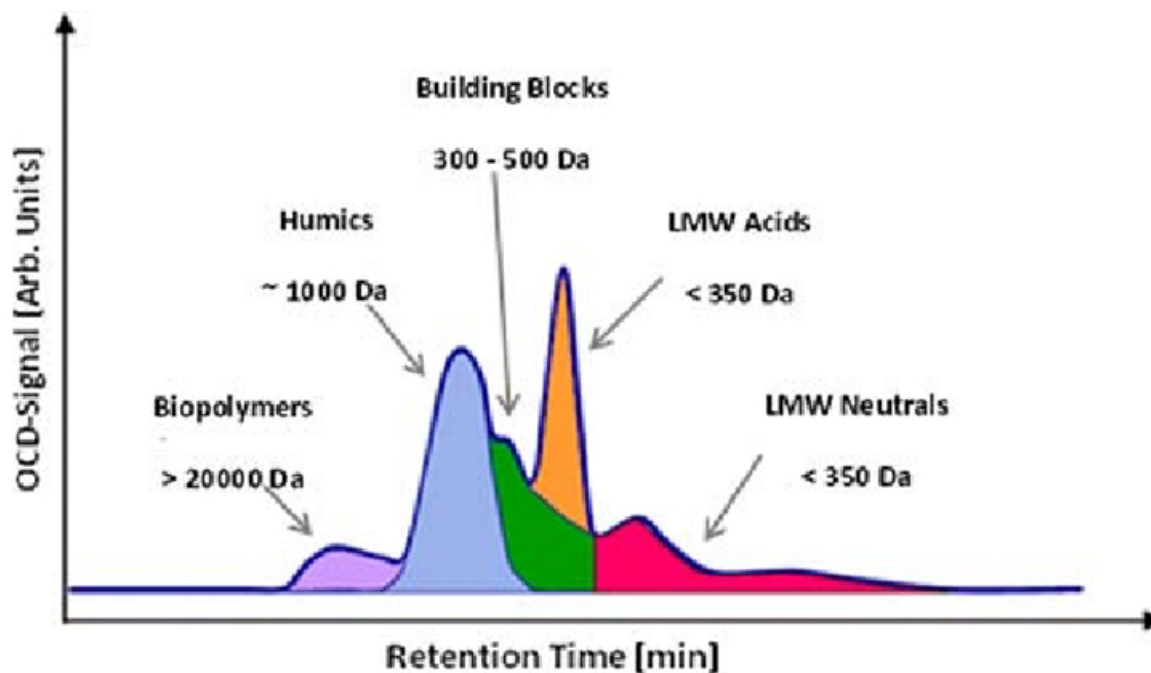


Figure 2.1. Overview of the five defined fractions of the LC-OCD analysis, which are defined based on retention time (X-axis) on a liquid chromatography column. The retention time is determined by molecular weight, with a higher retention time for molecules with a lower molecular weight. Biopolymers are defined as compounds with a molecular weight >20,000 Da (g/mol); Humics or humic substances are defined as the fraction made up of humic acids and fulvic acids with a molecular weight around 1000 Da, which is the size of aquatic humics, although humic and fulvic acids can range from 500 to >10,000 and maximally 20,000 Da (Thurman et al., 1982; Osterberg et al., 1993); Building Blocks are defined as the organic matter fraction with a molecular weight ranging from 300 to 500 Da, this fraction theoretically includes diprotic and triprotic acids (acids that release 2 or 3 protons in solution, respectively); Low Molecular Weight Acids are defined as monoprotic organic acids (acids that release 1 proton in solution) with a molecular weight <350 Da; Low Molecular Weight Neutrals are defined as small organic compounds without a charge and with a molecular weight <350 Da. The Y-axis displays the signal intensity of the organic carbon detector (OCD) in arbitrary units (Arb. Units), a higher signal indicates a higher quantity.

### 2.2.2 Fractionation and peak quantification

To determine the fractionation of the 13 selected compounds in the water matrices, the five LC-OCD categories were determined by the DOC-Labor based on retention time and peak shape of the chromatograms (Figure 2.2). Quantities of BP, HS, BB, LMWA and LMWN were determined by integration of the peaks. Net quantities for each compound in the respective drinking water matrix were determined by subtracting the quantity in the water matrix without added compound from the measurement with the compound.

It is important to mention that the quantification of the HS-fraction is largely based on the selected analysis software and often requires manual checking and correction. Since ultrapure water does not contain humics, the ultrapure water analysis was performed with the non-humic water software tool for LC-OCD data. Therefore, no HS peaks were measured in these analyses. Drinking water normally contains humics and, therefore, the drinking water analysis was performed with the humic water software tool for LC-OCD data.

Table 2.1. Overview of the 13 compounds used in this validation study.

Compound to validate	Size (Da)	Group	Relevance	Expected LC-OCD Fraction	Molecule classification
Amylopectin	6,000 - > 50,000	Poly-saccharides	Main component of cyanobacteria	BP and HS	BP
Laminarin	~5,000	Poly-saccharides	Storage polysaccharide in algae	HS	BP
Bovine serum albumin	66,500	Proteins	Readily available, soluble in water	BP	BP
Oxalic acid*	90	Diprotic acids	Rapidly biodegradable	BB**	LMWA
Oxaloacetic acid*	132	Diprotic acids	Rapidly biodegradable	BB**	LMWA
Citric acid *	192	Triprotic acids	Rapidly biodegradable	BB**	LMWA
Acetic acid*	60	Monoprotic acids	Rapidly biodegradable	LMWA	LMWA
Benzoate*	144	Monoprotic acids	Relatively biodegradeable, aromatic molecule	LMWA	LMWA
Palmitic acid*	256	Monoprotic acids	General fatty acid, linked to <i>Asellus</i> (KWR 2018.013)	LMWA	LMWA
Stearic acid*	284	Monoprotic acids	General fatty acid, linked to <i>Asellus</i> (KWR 2018.013)	LMWA	LMWA
Amino acid mix***	~110 Da	Amino acids	Through degradation of proteins a wide diversity of amino acids will be available	LMWN	LMWA/LMWN
Tryptophan	204	Amino acids	Complex amino acid with indol side chain	LMWN	LMWA/LMWN
Glucosamine	179	Aminosugars small	Naturally present in fungi and bacteria	LMWN	LMWN

\* sodium oxalate, sodium oxaloacetate, sodium citrate, sodium acetate, sodium benzoate, sodium palmitate, sodium stearate were dissolved to obtain these organic molecules in the water matrix.

\*\* Due to their diprotic and triprotic nature, these compounds are expected in the BB-fraction.

\*\*\* The AAS18 Supelco Amino Acid Standard contained ammonium chloride and the amino acids L-Alanine, L-Arginine, L-Aspartic acid, L-Cystine, L-Glutamic acid, Glycine, L-Histidine, L-Isoleucine, L-Leucine, L-Lysine, L-Methionine, L-Phenylalanine, L-Proline, L-Serine, L-Threonine, L-Tyrosine and L-Valine. Amino acids in this standard are 2.5  $\mu$ moles per mL in 0.1 N HCl, except L-cystine at 1.25  $\mu$ moles per mL.

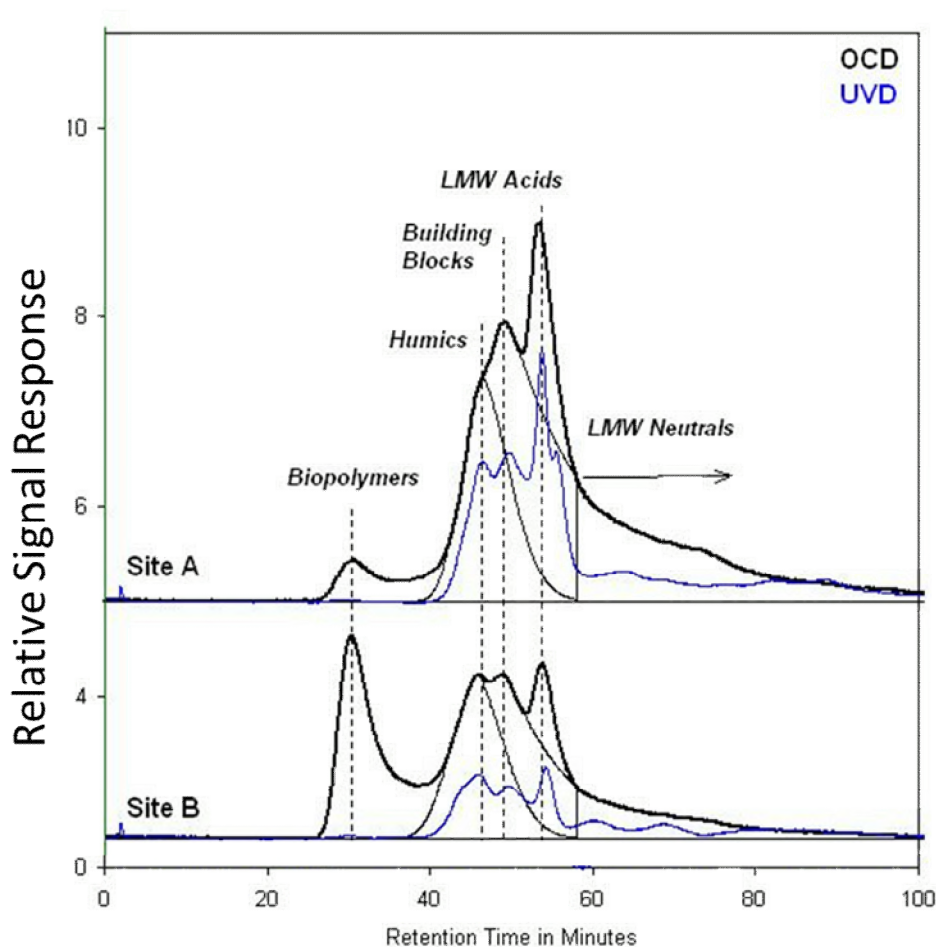


Figure 2.2. Example of retention times for two different tap water types *measured by the DOC-Labor*. Site A is drinking water produced from surface water subjected to flocculation and has a DOC of around 4 ppm. Site B is drinking water with an unusually high biopolymer concentration of 650  $\mu\text{g C/L}$ . The graph shows the Biopolymers fraction starting around 30 minutes, the Humics or Humic Acids fraction around 40-45 minutes, the Building Blocks occurring around 50 minutes, the Low Molecular Weight Acids around 55 minutes and the Low Molecular Weight Neutrals approximately after 55 minutes. Note that humics are only detected for humic-containing water types. It is important to note that the retention time can slightly differ between measurements, because certain treatment steps can influence the size of the humic acid fraction. For instance, flocculation removes preferably the higher molecular part of humics by which the peak maximum shifts to higher retention times.

### 2.2.3 Water matrices

Ultrapure water was selected as the validation matrix due to the very low levels of potentially interfering contaminations. The ultrapure water was prepared with a Milli-Q® Advantage A10 (Merck Millipore) packed with a Quantum® TEX polishing cartridge to remove ionic and organic contaminants. The average conductivity of the produced water is 0.05  $\mu\text{S/cm}$  or 18.2  $\text{M}\Omega/\text{cm}$ .

For testing the interaction of the compounds with drinking water matrices, two drinking water types from production location Tull en 't Waal and Berenplaat were selected. The drinking water from Tull en 't Waal is produced from anoxic groundwater that is treated by aeration, rapid sand filtration and softening. The water was sampled at the laboratory of KWR after flushing the tap for 15 minutes. The drinking water from Berenplaat is produced from surface water from the river Meuse and is first stored in a reservoir and subsequently treated with coagulation/flocculation, rapid sand filtration, UV, active carbon filtration and a low dosing of chlorine dioxide. The water was sampled by Aqualab Zuid (Werkendam, the Netherlands) at a continuous sampling point at the outgoing

water of production location Berenplaat.

These water types were chosen because the total organic carbon (TOC) content of both water types is similar (~2,1 mg C/L) (van der Wielen, 2018). The drinking water from Berenplaat has a comparatively higher growth potential and a higher concentration of biopolymers, as indicated by particulate and/or high-molecular organic carbon (PHMOC), PHCHC and a bioassay for slowly biodegradable compounds, based on growth of *Flavobacterium johnsoniae* strain A3 that utilizes polysaccharides and proteins (AOC-A3) (van der Kooij et al., 2015 for AOC-A3; Hijnen et al., 2018 for measurements).

#### 2.2.4 Preparation of solutions

For the 13 compounds a target concentration of 100 µg C/L was chosen for ultrapure water and 10 µg C/L for the two drinking water matrices (Table 2.2). The target concentration of 100 µg C/L in ultrapure water was chosen to improve the detection of single compounds during LC-OCD analysis. The target concentration of 10 µg C/L for drinking water was chosen in dialogue with the DOC-Labor in Karlsruhe, Germany (dr. Stefan Huber) to provide relevant scenarios for drinking water and, from the experience of DOC-Labor, should be able to be detected with LC-OCD in drinking water samples, although it could be a challenge to detect such low concentrations with LC-OCD in drinking water matrices.

The drinking water samples were collected in XAD-resin-cleaned stainless-steel containers. All solutions were prepared in ultraclean glassware and final samples were put in glassware provided by the DOC-Labor.

**Table 2.2. Overview of the target concentration calculations for 10 µg C/l (drinking water) and 100 µg C/l (ultrapure water) based on the molecular weight of carbon in the compound formula.**

Compound	Formula	Solubility	µg/l for 10 µg C/l	µg/l for 100 µg C/l
Amylopectin	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>26</sub>	Moderate soluble	23	230
Laminarin from Laminaria digitata	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	Soluble: 10 g L <sup>-1</sup>	23.3	233.3
Bovine Serum Albumin (BSA)	C <sub>123</sub> H <sub>193</sub> N <sub>35</sub> O <sub>37</sub> *	Soluble: 40 g L <sup>-1</sup>	18.6	186.4
Sodium oxalate	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	Soluble: 37 g L <sup>-1</sup>	55.8	557.8
Oxaloacetic acid	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	Soluble: 100 g L <sup>-1</sup>	27.5	274.9
Sodium citrate monobasic	NaC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	Soluble: 435 g L <sup>-1</sup>	29.4	294.3
Sodium acetate	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	Soluble: 1233 g L <sup>-1</sup>	34.1	341.5
Sodium benzoate	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub>	Soluble: >628 g L <sup>-1</sup>	17.1	171.4
Sodium palmitate	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NaO <sub>2</sub>	Insoluble: 0.00013 g L <sup>-1</sup>	14.5	144.9
Sodium stearate	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NaO <sub>2</sub>	Soluble	14.2	141.8
Amino Acid Standard**	R-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> ***	Soluble	30.8****	308.3****
DL-Tryptophan	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Soluble	15.5	154.6
D-(+)-Glucosamine hydrochloride	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>5</sub>	Soluble	29.9	299.2

\*The standard formula for bovine serum albumin.

\*\*For calculations 110 g/mol is used as the documented average molecular weight.

\*\*\*The basic formula for amino acids with R indicating the amino acid specific and characteristic side chain.

\*\*\*\*The amino acids standard comes as a solution in 1 N HCl. Therefore, the µg C/L concentrations approach 3 and 31 µg C/L instead of 10 and 100 µg C/L.

#### 2.2.5 Shipment and analysis

Immediately after preparation the samples were shipped according to the standard procedure, i.e. overnight shipment to the DOC-Labor in cool boxes provided by DOC-Labor and fitted with frozen cooling elements. The cooling box was placed in an EPS (expanded polystyrene, Tempex) box with frozen cooling elements. All samples arrived at fridge temperature and were stored cold until analysis. All samples were analyzed on the day of arrival.

## 2.3 Results

The 13 selected compounds were first added to ultrapure water in the laboratory (UPW) to map the fractionation in a water matrix without interfering natural organic matter (NOM) by subsequently analyzing these compounds in a buffer solution on the LC-OCD. Next, the 13 compounds were added to two drinking water matrices to investigate interactions with NOM fractions in these matrices and were also subsequently analyzed in the same buffer solution on the LC-OCD. Figure 2.3 shows a principle coordinate analysis (PCoA) of the relative abundance of the different samples measured with LC-OCD results. The PCoA plot indicates that the measurements in UPW clearly show effects of the type of compound that was added. The acids (oxaloacetic acid, oxalate, citrate, acetate and benzoate) cluster together, the larger compounds (amylopectin, laminarin, BSA as well as palmitate and stearate) cluster also closer together and the blank ("blanco") does not cluster with any of the additions. The results in the Berenplaat (BPL) and KWR water show a close clustering of all the samples, including the drinking water without any additions. This indicates that the LC-OCD results are mainly determined by the water matrix itself and not by the low concentrations ( $10 \mu\text{g C/L}$ ) of the added compounds, demonstrating that concentrations changes in the  $10 \mu\text{g C L}^{-1}$  range cannot be reliably detected by LC-OCD. Therefore, the results of the two drinking water matrices have to be interpreted with care. When a PCoA plot is made for each water type separately, then it was also observed that compounds were clustered by their molecular characteristics for ultrapure water, but a clustering of the compounds by molecular characteristics was again not observed for Berenplaat or KWR water (Appendix I.II).

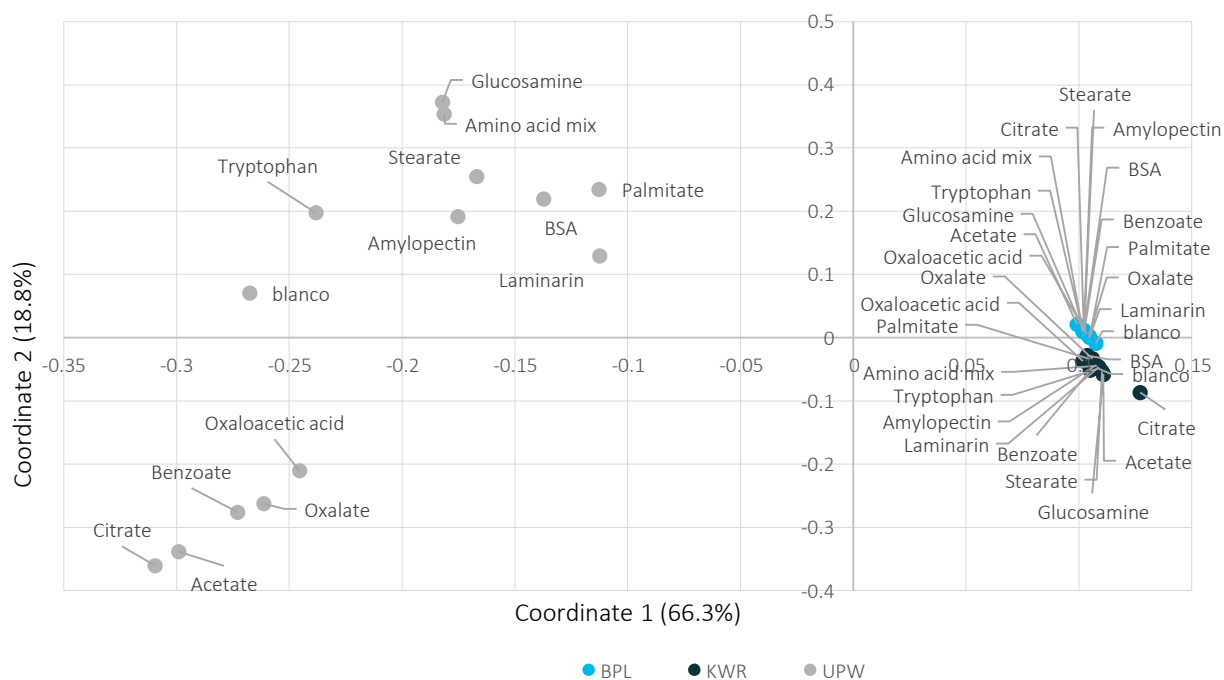


Figure 2.3. Principal coordinate analysis (PCoA) plot with Bray-Curtis dissimilarity of the five LC-OCD fractions for the ultrapure water (UPW) analyses and the analyses in the Berenplaat (BPL) and KWR drinking water matrices. Each dot represents a water sample with one of the 13 added compounds, as indicated in the graph. The distance between the dots visualizes the differences between the samples. The further two samples are apart, the larger the differences between them. The percentages on the two axes display how much of the variance between the samples is explained by the respective axis.

### 2.3.1 Measurements in ultrapure water

The analysis in UPW provides a good set-up to investigate the LC-OCD fractionation in a non-interfering water matrix. The objective of this study was to validate the fractionation of the 13 selected compounds and to investigate whether the compounds follow the fractionation expected based on the LC-OCD category definitions and the molecular characteristics (Table 2.1).

#### General parameters

General water quality parameters were measured to investigate the behavior of the 13 selected compounds in the UPW matrix (Table 2.3). The total dissolved organic carbon (DOC) that is present in a sample is split up into two fractions for the LC-OCD analysis: the hydrophobic organic carbon (HOC) and the chromatographic dissolved organic carbon (CDOC). The CDOC fraction is calculated by summing up all LC-OCD peaks and is therefore the fraction that is analyzed. The HOC is the fraction that does not pass through the filters and liquid chromatography set-up and is therefore considered hydrophobic. A typical HOC fraction for drinking water is about 10% of the total DOC (data DOC-Labor 2009, 2020). For UPW without any additions (negative blank) we observed a relatively large HOC fraction that was 48% of the DOC. Since ultrapure water should have very low DOC concentrations (1 µg C/l), the DOC concentrations measured in UPW likely comes from the laboratory surrounding or buffer solution. It should be noted further that the DOC concentration (and the HOC concentration) is ten times lower in ultrapure water than in drinking water.

For the DOC measurements of the 13 compounds, we calculated the net DOC by subtracting the UPW blank from the measurements with UPW and each of the added compounds. Assuming that all compounds fully dissolve in the water matrix, the net DOC amounts for the individual compounds in UPW should approach the 100 µg C/L that was added. The net DOC was subsequently used to calculate the recovery (Table 2.3). Lower values indicate poor recovery that can be caused by lower solubility or adsorption. Amylopectin, BSA, amino acid mixture and stearate show recoveries below 50%. All other compounds show higher recoveries (>77%), with some compounds (benzoate, oxaloacetic acid and citrate) showing recoveries above 150%.

Nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) and ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ) levels were mostly below the detection limit. Only for the organic acids oxalate, oxaloacetic acid, citrate and benzoate a slightly higher ammonium signal was detected, but this is within the variation range in UPW without any additions. There is, however, no direct link to available nitrogen species in the water. For the amino acid mix, no ammonium signal was detected, although the standard contained ammonium chloride. For tryptophan a slightly higher signal was found, but also this is within the variation range of the blank. The inorganic colloids (IC) fraction was slightly higher for the larger and more complex compounds, which are amylopectin (6-50 kDa), laminarin (~6 kDa), benzoate (ring structure) and palmitate (relatively hydrophobic). The low IC fraction for stearate is likely caused by the low recovery. The IC fraction thus seems to be a good indicator for the solubility of individual compounds when their recovery is sufficient.

The specific UV absorbance (SUVA) is defined as the UV absorbance of a water sample at a specific wavelength, in this case 254 nm, normalized for the DOC concentration. SUVA values above the average were observed for the UPW samples with the amino acid mix ( $7.9 \text{ L mg-C}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ), amylopectin ( $5.2 \text{ L mg-C}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ), stearate ( $4.3 \text{ L mg-C}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ) and BSA ( $3.8 \text{ L mg-C}^{-1} \text{ m}^{-1}$ ). The amino acid mix contains three aromatic amino acids: tryptophan, tyrosine and phenylalanine. However, the tryptophan sample does not show a SUVA above the average. In contrast with tryptophan, which has an indole ring and is generally soluble in water (0.23 g/L), tyrosine and phenylalanine have 6-carbon aromatic rings, which makes them over one order of magnitude less soluble in water (maximally 0.50 mg/L). The lowest SUVA values, all below the blank measurement, were observed for citrate, acetate and benzoate.



Table 2.3. Overview of the general and additional parameters determined in the LC-OCD analysis with ultrapure water. These parameters include total dissolved organic carbon (DOC), hydrophobic organic carbon (HOC), chromatographic dissolved organic carbon (CDOC), nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ), ammonium ( $\text{NH}_4^+$ ), inorganic colloids (IC) and specific UV absorbance at 254 nm divided by the DOC (SAC/DOC=SUVA). The net DOC and CDOC are calculated by subtracting the Blank DOC/CDOC from the total DOC/CDOC for each solution. The recovery rate for the added substrate is provided in the Net DOC column as well.

Compound	DOC ( $\mu\text{g-C L}^{-1}$ )	Net DOC ( $\mu\text{g-C L}^{-1}$ )	HOC ( $\mu\text{g-C L}^{-1}$ )	CDOC ( $\mu\text{g-C L}^{-1}$ )	$\text{NO}_3^-$ ( $\mu\text{g-N L}^{-1}$ )	$\text{NH}_4^+$ ( $\mu\text{g-N L}^{-1}$ )	IC ( $\text{m}^{-1}$ )	SUVA ( $\text{L mg-C}^{-1} \text{m}^{-1}$ )
Amylopectin	131	11 (11% <sup>§</sup> )	20	111 (85% <sup>&amp;</sup> )	4	<1	0.04	5.2
Laminarin	191	71 (71%)	51	140 (73%)	<1	<1	0.02	2.6
BSA	123	3 (3%)	41	82 (67%)	<1	<1	0.01	3.79
Oxalate	236	116 (116%)	84	153 (65%)	<1	1	<0.01	2.27
Oxaloacetic acid	286	166 (166%)	158	128 (45%)	<1	2	<0.01	2.24
Citrate	329	209 (209%)	118	211 (64%)	<1	3	0.01	1.36
Acetate	249	129 (129%)	132	117 (47%)	<1	<1	<0.01	1.69
Benzoate	303	183 (183%)	99	204 (67%)	3	1	0.02	1.95
Palmitate	191	71 (71%)	49	142 (74%)	3	<1	0.03	2.82
Stearate	87	0* (0%)	49	38 (44%)	<1	<1	<0.01	4.28
Amino acid mix	60	0* (0%)	<1	60 (100%)	<1	<1	<0.01	7.87
Tryptophan	264	144 (144%)	55	210 (80%)	<1	3	0.01	2.56
Glucosamine	166	46 (46%)	38	129 (78%)	<1	<1	0.02	2.18
Blank	120	-	58	63 (53%)	<1	1	<0.01	2.72
<b>Average <math>\pm</math>sd</b>	<b>195 <math>\pm</math>85</b>		<b>73 <math>\pm</math>42</b>	<b>128 <math>\pm</math>55</b>	<b>3.3 <math>\pm</math>0.6</b>	<b>1.8 <math>\pm</math>1.0</b>	<b>0.02 <math>\pm</math>0.01</b>	<b>3.11 <math>\pm</math>1.72</b>

\* indicates the net measurement was below zero.

<sup>§</sup> Percentage shows the recovery of the added substrate (100  $\mu\text{g C/l}$ ).

<sup>&</sup> Percentage shows the percentage of the DOC that belonged to CDOC.

First, pure UPW was analysed to quantify background concentrations of the ultrapure water matrix (Figure 2.4). A single clear peak around the BB/LMWA fraction was observed. The small peak to the right (70 – 80 min retention time) falls in the range of the LMWN fraction. It is worth noting that there is an overlap between the BB and LMWA fractions, which is illustrated in Figure 2.1 and for example clearly shown by the examples in Figure 2.2. However, the comparison of the peak patterns for the different compounds cannot reliably be done, since each graph displays the relative signal response of each compound. This means that a high peak observed for one compound does not necessarily correspond to a high concentration in the respective fraction.

All LC-OCD chromatograms were analysed and categorized into the five defined categories. Table 2.4 shows an overview of the 13 selected compounds and the net quantities in  $\mu\text{g C/L}$  measured in each LC-OCD fraction. These net quantities were calculated by subtracting the concentrations for each fraction measured in the blank from the concentrations of each sample with an added substrate. In several cases the blank concentration of a certain fraction was higher than the concentration measured in the sample with an added substrate. As a result, the sum concentrations of certain compounds differ from those in Table 2.3. To clarify this point better, the observations with BSA are explained in more detail. From Table 2.4, it can be seen that the BP and BB concentrations in the samples with BSA were higher than the concentrations in the blank, resulting in a net concentration of 30  $\mu\text{g C/L}$  (BP) and 14  $\mu\text{g C/L}$  (BB). For the LMWA and LMWN fractions, however, the concentration of the blank was higher than the concentration of the sample with BSA and because negative values are not realistic, these concentrations were set to 0  $\mu\text{g C/L}$ . However, in the total calculations of the DOC concentrations from LC-OCD, as shown in Table 2.3, all fractions were added together for each sample. Therefore, the net concentrations from Table 2.4 for BSA (44  $\mu\text{g C/L}$ ) differs from the net concentrations from Table 2.3 (3  $\mu\text{g C/L}$ ). The results, thus, demonstrate that the variation in LC-OCD fractions can be quite big when a matrix without or very low DOC concentrations is used.

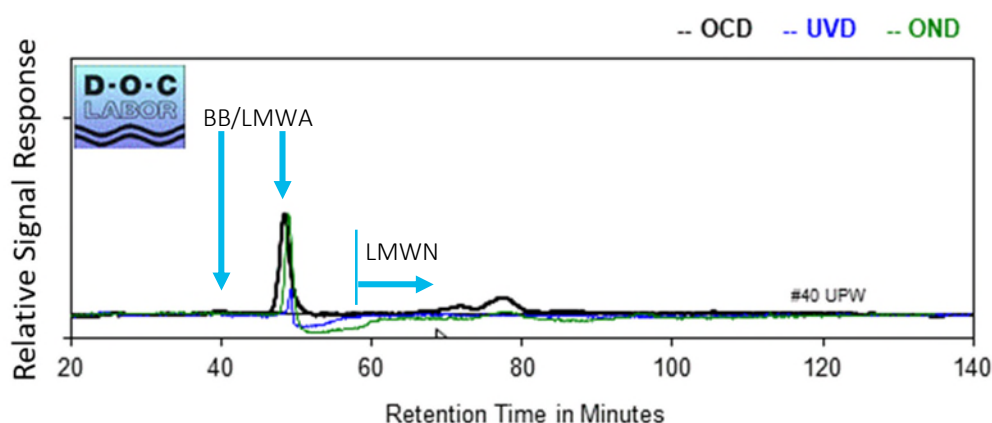


Figure 2.4. LC-OCD chromatogram of the ultrapure water (UPW) matrix. The integrated peak intensities in  $\mu\text{g C/L}$  are BP: <1 (~0% of total), HS: n.d.; BB: 4 (6% of total); LMWA: 29 (46% of total) and LMWN 30 (48% of total). The total carbon content of the UPW was 63  $\mu\text{g C/L}$ .

Table 2.4. Net quantities of total carbon for the added compounds in ultrapure water, displayed in  $\mu\text{g C/L}$ . Colour code: Blue, molecule falls in the expected LC-OCD fractions; Yellow, molecule falls in the fraction based on molecule classification; Green, molecule falls both in expected LC-OCD fraction and fraction based on molecule classification. n.d. = not detected; 0\* = net measurement below zero.

Compound ↓ Fraction →	BP	HS	BB	LMWA	LMWN
Amylopectin	13 (27%)	n.d.	22 (45%)	1 (2%)	13 (27%)
Laminarin	5 (5%)	n.d.	96 (95%)	0* (0%)	0* (0%)
BSA	30 (68%)	n.d.	14 (32%)	0* (0%)	0* (0%)
Oxalate	0 (0%)	n.d.	6 (6%)	100 (94%)	0* (0%)
Oxaloacetic acid	0 (0%)	n.d.	7 (9%)	70 (91%)	0* (0%)
Citrate	0 (0%)	n.d.	0* (0%)	176 (100%)	0* (0%)
Acetate	0 (0%)	n.d.	0* (0%)	82 (100%)	0* (0%)
Benzoate	0 (0%)	n.d.	0 (0%)	148 (100%)	0* (0%)
Palmitate*	29 (30%)	n.d.	67 (70%)	0* (0%)	0* (0%)
Stearate*	3 (38%)	n.d.	5 (63%)	0* (0%)	0* (0%)
Amino acid mix**	2 (9%)	n.d.	0 (0%)	0* (0%)	20 (91%)
Tryptophan	4 (3%)	n.d.	10 (7%)	35 (24%)	98 (67%)
Glucosamine	5 (6%)	n.d.	1 (1%)	0* (0%)	81 (93%)

\*Palmitate and stearate cannot be measured well with the LC-OCD method due to adsorption on surfaces

\*\*The actual added concentration of the amino acid mix is 29  $\mu\text{g C/L}$ .

### Amylopectin

Amylopectin is a complex polysaccharide that is composed of long chains of glucose linked with  $\alpha(1\rightarrow4)$  glycosidic bonds. The overall recovery of 49  $\mu\text{g C/L}$  indicates recovery issues which can for example be caused by adherence to glass surfaces or issues with dissolving the compound in water (Green et al., 1975). Amylopectin has a high average molecular weight ranging from 6 to 50 kDa. Amylopectin thus occurs in the form of smaller polymers at 6 kDa and larger biopolymers with a molecular weight of up to 50 kDa. Only a small fraction of amylopectin was detected in the BP-fraction, indicating a small amylopectin fraction with a high molecular weight (Figure 2.5; Table 2.4). The largest fraction (73%) was found in the BB, LMWA and LMWN fraction with a size range of up to 0.5 kDa, suggesting the presence or formation of much smaller amylopectin molecules.

### Laminarin

Laminarin is a complex polysaccharide composed of long chains of glucose and is made up of  $\beta(1\rightarrow3)$ -glucan with  $\beta(1\rightarrow6)$ -branches. Laminarin shows a good recovery with 101  $\mu\text{g C/L}$  (Table 2.4). In total 95% of the laminarin-fraction was detected in the BB fraction, although it was expected in either the BP or HS fraction. The LC-OCD graph does indicate the largest peak in the BB/LMWA fraction (Figure 2.5). Similarly, as for amylopectin, the reported molecular weight for laminarin is an average molecular weight, which explains the spread over different fractions. However, purified laminarin has a relatively narrow molecular weight range of 5.7-6.2 kDa, which is not in line with the observed large spread here (Rajauria et al., 2021). Laminarin is a stretched elongated polysaccharide, which can have longer retention times due to hydrogen bridges and van der Waals interactions and explains why it was observed in the BB fraction instead of the BP fraction.

### Bovine Serum Albumin (BSA)

BSA is a large serum protein derived from cow blood. Due to its large size of 66.5 kDa it is expected in the BP fraction. Overall, the recovery of BSA was comparatively low and the results need to be interpreted with caution. As expected, we observed a major peak in the BP fraction, which constituted 68% of the total net peaks in the LC-OCD spectrum (Figure 2.6, Table 2.4). However, a second peak (32%) was identified in the BB fraction, which might indicate hydrolysis of BSA.

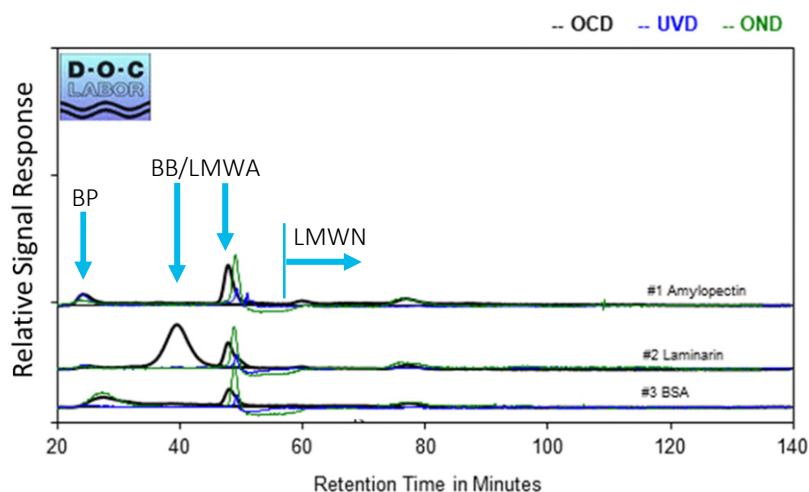


Figure 2.5. LC-OCD chromatogram for amylopectin, laminarin and BSA in UPW. The BP fraction shows clear peaks for amylopectin and BSA. The peak around 50 minutes is caused by the UPW matrix. A clear first BB/LMWA peak is observed for laminarin. The LMWN fraction shows clearest peaks for amylopectin.

### Oxalate, oxaloacetic acid and citrate

Oxalate (anion of oxalic acid), oxaloacetic acid, and citrate (anion of citric acid) are all small organic acids that are expected in the BB fraction based on their diprotic and triprotic nature. However, LC-OCD analysis indicated that all three acids occur mostly in the LMWA fraction based on recovered  $\mu\text{g C/L}$  after peak integration (94%, 91% and 100%, respectively). These compounds thus follow the expectations based on their molecular characteristics, despite their diprotic and triprotic nature (Figure 2.6, Table 2.4). It remains uncertain whether this is caused by the fact that the diprotic/triprotic nature does not affect the LC-OCD analyses or because monoprotic acids are also present in oxalate and citrate, disturbing the analysis of the diprotic and triprotic acids. The clear first BB/LMWA peak for oxalate, oxaloacetic acid and citrate correspond to relatively low  $\mu\text{g C/L}$  quantities for the BB fraction (6%, 9% and net 0%, respectively) and most of the peaks are identified as LMWA. For acetate, the first peak was not observed, which indicates that di- and triprotic acids respond differently than the monoprotic acetate.

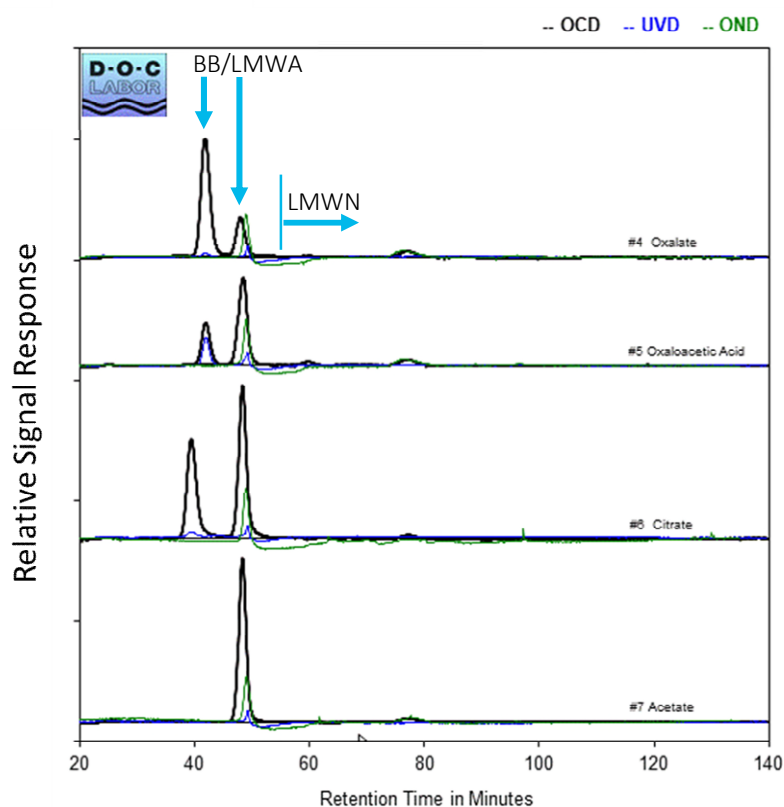


Figure 2.6. LC-OCD chromatogram for the di- and triprotic acids oxalate, oxaloacetic acid and citrate and acetate in UPW as comparison. The LMWA peak around 40 minutes is present in the UPW matrix and was detected in the samples with oxalate, oxaloacetic acid and citrate, but not in the sample with acetate.

### Acetate and benzoate

Acetate and benzoate are small, organic, monoprotic acids. After peak integration, both compounds were only detected in the LMWA-fraction (100%), therewith following the expectations based on LC-OCD fractionation and their molecular characteristics. The high total carbon recoveries further support these findings. Interestingly, benzoate shows a double second peak pattern at the retention time of the BB/LMWA fraction, which is not observed for the other compounds (Figure 2.7, Table 2.4). This double peak is observed, because benzoate eluates at the “ramp” where buffer is replaced by the buffer-free front of the sample.

### Palmitate and stearate

Palmitate and stearate are relatively large organic acids (256 and 284 Da) with palmitate having a poor solubility in water ( $0.00013 \text{ g L}^{-1}$ , respectively). Due to their poor solubility in water, palmitate is prone to interact with glass matrices that are used in the experimental work. However, we observed a high total recovery of  $96 \mu\text{g C/L}$  (96%) for palmitate, indicating that solubility and adsorption might play a much smaller role (Table 2.4). The high total recovery, known challenges with solubility and adsorption for palmitate still stress that these results should be interpreted with care (personal communication with Stefan Huber, DOC-Labor).

For palmitate, only minor peaks were detected in the BB/LMWA and LMWN fraction (Figure 2.7). The largest integrated peak for palmitate was detected in the BB fraction (70%) and a second peak was found in the BP fraction (30%) and, thus, not in the expected LMWA fraction.

For stearate, clear signs of adsorption were observed in the low total recovery of organic matter which was only  $8 \mu\text{g C/L}$  (8%) (Table 2.4). As was observed for palmitate, no net peaks were detected in the expected LMWA and LMWN fraction. Only minor peaks were detected in the BB fraction after peak integration (62%) and the second peak in the BP fraction (38%), but due to the low recovery a definite link to stearate cannot be made (Figure 2.7).

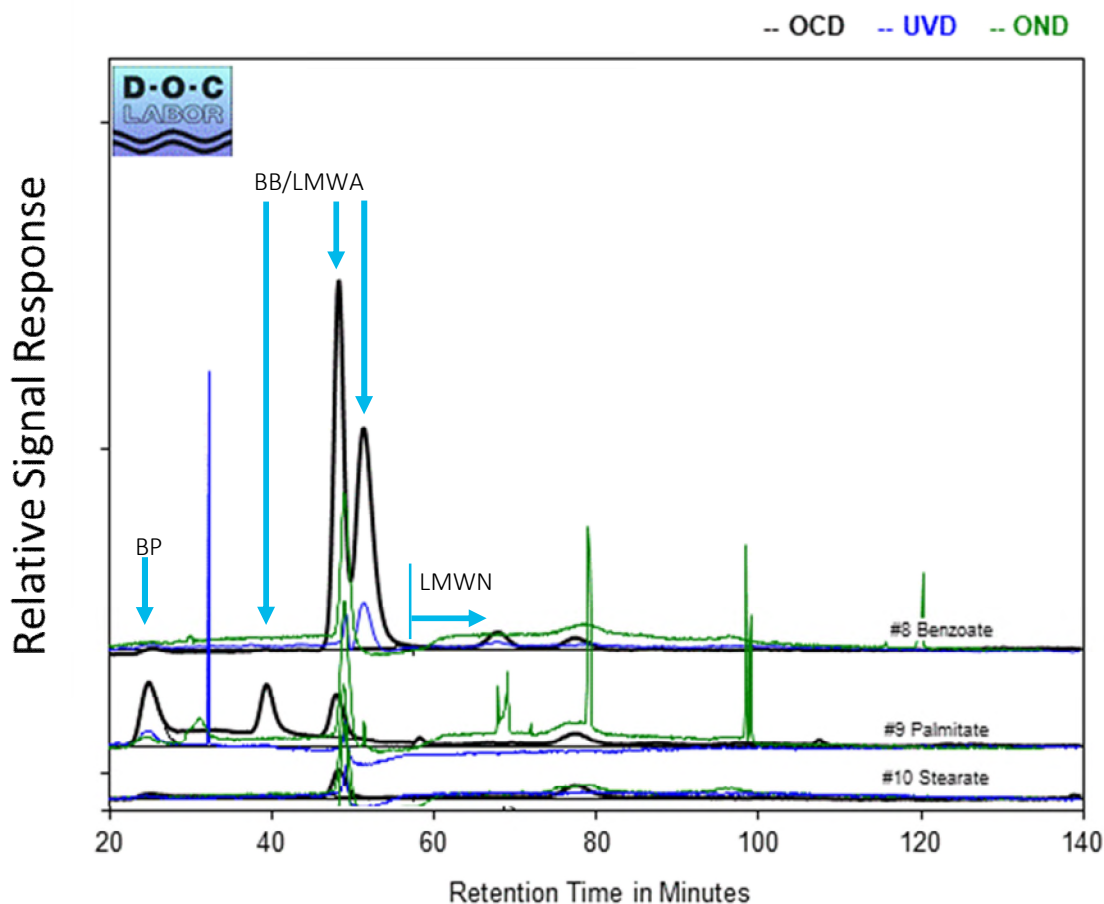


Figure 2.7. LC-OCD chromatogram for benzoate, palmitate and stearate in UPW. The LMWA peak around 50 minutes is present in the UPW matrix. The second LMWA peak for benzoate is a unique feature of this compound.

#### The amino acid standard and tryptophan

The amino acid standard used in this study was composed of 17 out of the 20 common amino acids (Table 2.1). In total approximately 31  $\mu\text{g C/L}$  was added to the UPW matrix (Table in appendices). The high recovery of total organic carbon in the BP and LMWN fraction (22  $\mu\text{g C/L}$ ; 71%) indicates that the LC-OCD method is suitable for the detection of most of the amino acids (Figure 2.8) when only the BP and LMWN fraction are analysed. The largest net integrated peak was observed in the LMWN fraction (91%), which follows the expectation based on the LC-OCD categorization as well as the molecular characteristics.

Tryptophan, the largest amino acid with a molecular weight of 110 Da and an indole side chain ( $\text{C}_8\text{H}_7\text{N}$  consisting of a benzene ring fused to a five-carbon pyrrole ring), was mainly detected in the LMWN fraction (67%). This follows the expectation based on LC-OCD categorization and the molecular characteristics (Table 2.4). After integration, the second largest part was detected in the LMWA fraction (24%) and only small net amounts were observed in the BP and BB fraction (Figure 2.8). The high total recovery of tryptophan (147  $\mu\text{g C/L}$ ) indicates that a good recovery can also be found for more complex amino acids.

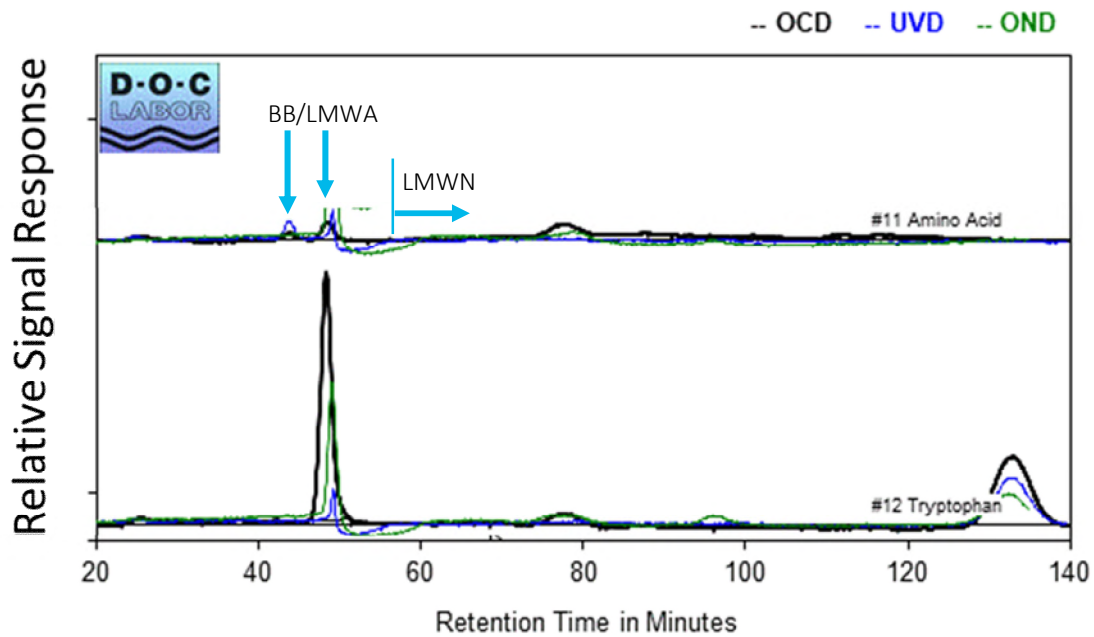


Figure 2.8. LC-OCD chromatogram for the amino acid mixture and tryptophan in UPW.

**Glucosamine**

Glucosamine is an abundant amino sugar that is synthesized from glutamine and glucose. The largest amount was detected in the LMWN fraction, which follows the expectation based on the LC-OCD category and the molecular characteristics (Figure 2.9, Table 2.4). The high recovery of 87 µg C/L (87%) further supports the observations.

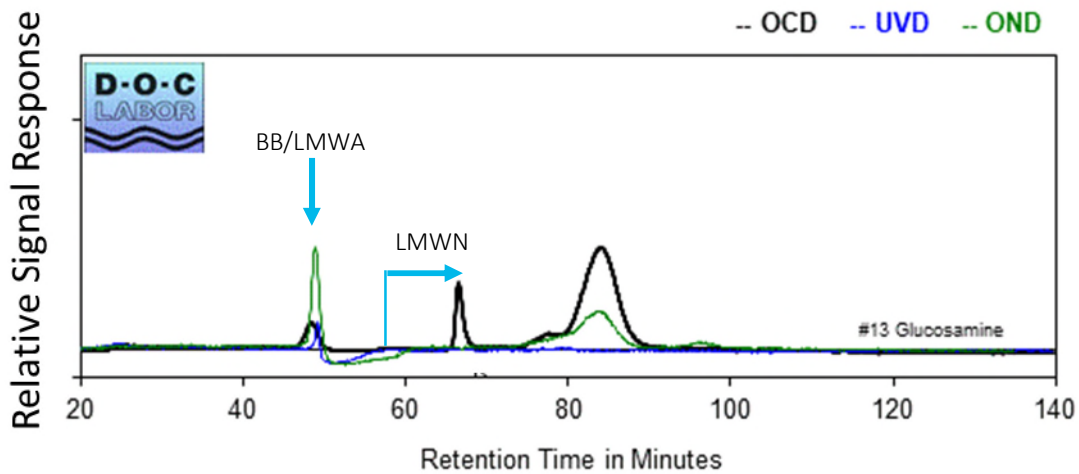


Figure 2.9. LC-OCD chromatogram for glucosamine in UPW.

### Summary of observations in ultrapure water

- The observed variations in recovery rates provide challenges for the interpretation of the LC-OCD results, especially since both recovered and unrecovered fractions might act as nutrients for regrowth in the distribution system.
- The complex organic compounds tested in this study (amylopectin, laminarin, BSA) form major peaks in the smaller LC-OCD categories, with biggest shifts for amylopectin and laminarin likely due to the spread in larger and smaller molecules that are naturally present.
- Organic acids follow the expected fractionation based on their molecular characteristics, but not on their mono-, di- and triprotic nature. It remains unknown whether this is caused by the fact that the di- and triprotic nature does not affect the LC-OCD analysis or whether the acids with a di- and triprotic nature also contained monoprotic acids as well.
- Stearate, as an example of a hydrophobic organic acid, cannot be properly measured by the LC-OCD method due to adsorption on surfaces. Small fractions occur in the larger BB- and BP-fraction.
- Amino acids show good recovery rates and follow the fractionation based on both the LC-OCD category and molecular characteristics.
- Glucosamine largely follows the expected fragmentation based on both LC-OCD category and molecular characteristics.

### 2.3.2 Measurements in drinking water matrices

Next, the compounds were dissolved in two drinking water matrices to investigate the interaction with organic matter fractions that are naturally present in drinking water. The objective of this study was to investigate the extent to which natural organic matter (NOM) of the drinking water matrix interacts with a range of added organic compounds. Interactions can result in the formation of organic matter complexes and cause the chemical conversion of the added compounds, therewith affecting the LC-OCD fractionation results.

The principle coordinate analysis (PCoA) clearly indicated that the high background concentrations of NOM largely steers the fractionation outcome. The clear compound-specific patterns that were observed for UPW were not observed for both KWR and BPL water. This is likely caused by the relatively low concentrations of added compounds (10 µg C/L versus >1500 µg C/L already present as NOM), and the variation of LC-OCD measurements of the NOM is probably larger than the low concentration added to both water types. Consequently, the interaction of the added compounds with the natural organic matter cannot be made reliable and only the results from the two drinking water types are discussed.

### Composition of the drinking water matrices

Previous studies have shown that the total organic carbon (TOC) content of both water types is similar (~2.1 mg C/L) (van der Wielen et al., 2018). The LC-OCD analyses showed a slightly higher DOC concentration for KWR drinking water (1.7 mg C/L) than for drinking water from Berenplaat (1.5 mg C/L). HOC-fractions were low for both water bodies (17 and <1 µg C/L, respectively) (Figure 2.10, Table 2.5).

The BPL drinking water has a comparatively higher growth potential and a higher concentration of biopolymers, as indicated by previous studies (van der Wielen, 2018; Hijnen et al., 2018). The LC-OCD results support these results and indicate clearly higher BP-values for BPL water (58 µg C/L) than KWR water (2 µg C/L). Both KWR and BPL water have relatively high HS fractions (69% of CDOC for KWR and 66% of CDOC for BPL water), but in absolute concentration HS was clearly higher in KWR drinking water (1.2 mg C/L) than BPL drinking water (0.99 mg C/L). BB concentrations in both water types were comparable, whereas KWR water had slightly higher concentrations of LMWA and LMWN (Table 2.5). Nitrate (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) concentrations in both water types showed large differences. KWR water showed a NO<sub>3</sub><sup>-</sup> content above 396 µg N/L, whereas NO<sub>3</sub><sup>-</sup> was not detected in the BPL water.

Table 2.5. Overview of the composition of the KWR water and the Berenplaat (BPL) water with UPW as reference. DOC, HOC, CDOC and the LC-OCD fractions are displayed in  $\mu\text{g C/L}$ ; nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) is displayed in  $\mu\text{g N/L}$ .

Water type ↓ Fraction →	DOC	HOC	CDOC	BP	HS	BB	LMWA	LMWN	$\text{NO}_3^-$
KWR	1682	17	1665	2	1153	290	18	203	>396
BPL	1504	<1	1504	58	992	292	<1	163	n.d.
UPW	120	58	62	<1	N/A	4	29	30	<1

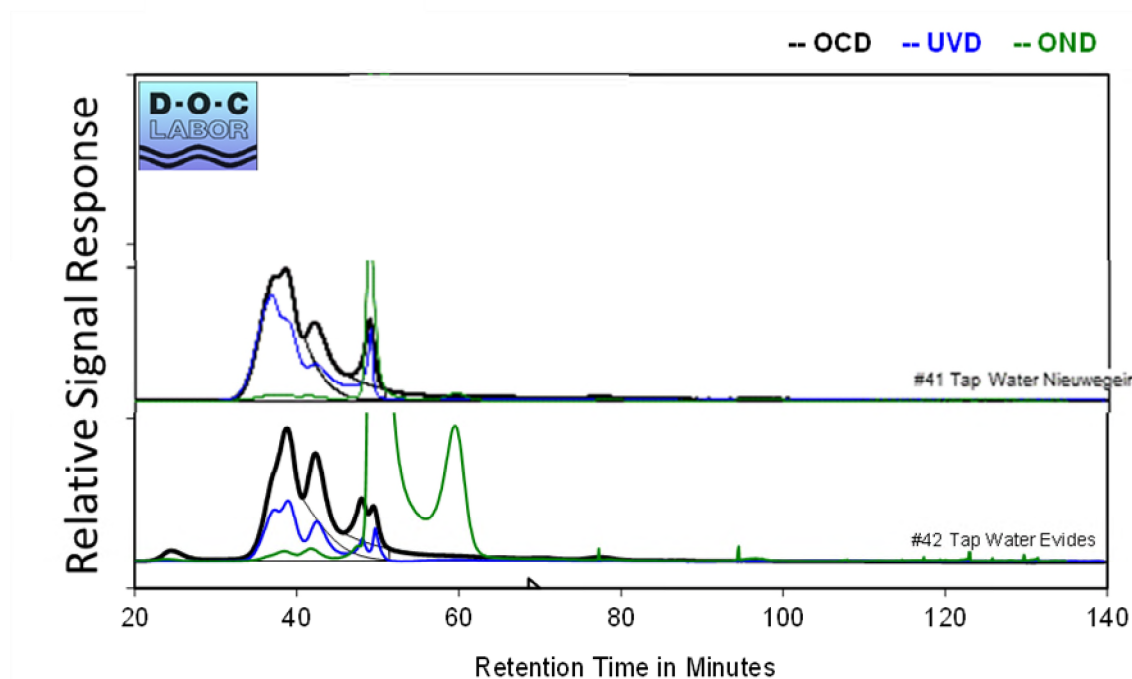


Figure 2.10. LC-OCD fractionation of the two drinking water matrices. Tap Water Nieuwegein is KWR water; Tap Water Evides is BPL water.

#### Summary of observations in the two drinking water matrices

- With the current set-up in which low concentrations ( $10 \mu\text{g C/L}$  per compound) were added to two drinking water matrices with  $\sim 1500 \mu\text{g C/L}$  of DOC, the variation in the concentrations of the LC-OCD fractions were higher for the NOM present in both drinking water types than the added concentration of each compound. As such, the low concentrations of each compound could not be reliably detected nor quantified.
- BPL water shows clearly higher BP-values than KWR water ( $58 \mu\text{g C/L}$  versus  $2 \mu\text{g C/L}$ ). KWR water showed high nitrate contents, whereas nitrate was not detected in BPL water.

## 2.4 Discussion

The LC-OCD method is commonly used to investigate the water quality of drinking water matrices and to provide information on biological stability. Several organic compounds, including polysaccharides, proteins, organic acids, amino acids and (amino)sugars can be used by micro-organisms in drinking water systems for energy conservation and growth, therewith providing risk for regrowth in drinking water distribution systems (see for example Sack et al., 2014 and Hijnen et al., 2018). The LC-OCD method is used to quantify five major categories of organic compounds, which provides information on the drinking water quality and the potential for microbial regrowth. However, validation studies for relevant organic compounds in drinking water were lacking, therewith limiting interpretations of the results. Our limited validation study in UPW provides a first insight in LC-OCD fractionation patterns for 13 compounds that could be relevant for drinking water.



#### 2.4.1 Amylopectin and laminarin appear in different LC-OCD fractions

Studying the fractionation of **amylopectin** and **laminarin** in UPW appeared challenging, due to their natural occurrence as smaller and larger molecules. The relatively complex structure and the absence of a standardized weight mixture of amylopectin caused the fragmentation in three different LC-OCD fractions for the UPW matrix. Due to the neutral nature of amylopectin, the smallest fractions are expected in the LMWN-fraction and not in the LMWA-fraction, which was in line with our observations. As expected, the largest peaks were observed in the high molecular weight BP and BB fractions.

Regarding its biological stability, a previous study showed that individually added amylopectin is not used by microbial communities in flowing tap water systems (Sack et al., 2014). Overall, amylopectin is not a common substrate in freshwater bodies and is therefore less likely to be rapidly degraded, since the *in situ* microbial communities are not adapted to use this substrate. Only when acetate or maltose, a simple sugar, were added together with amylopectin, an increase in biofilm formation rate (BFR) was observed from <6 to up to 980 pg ATP cm<sup>-2</sup> day<sup>-1</sup>. This suggests that organic acids and sugars present in the drinking water matrix largely influence the fate of amylopectin.

Laminarin shows comparable fractionation patterns to amylopectin. The previous study by Sack and co-workers also tested laminarin and observed direct utilization without the addition of small organic compounds (Sack et al., 2014). A likely explanation is that, especially for surface water, laminarin is commonly available due to the production of this compound by algae. The *in situ* microbial communities are therefore adapted to using laminarin as substrate, despite its more complex molecular structure compared to amylopectin. Potential microbial degradation would support a larger shift towards the LMWA and LMWN fractions.

#### 2.4.2 Bovine serum albumin (BSA) is a carrier molecule that might interact with NOM

**BSA** is a globular protein with a standardized molecular weight of around 66 kDa. This supports the fractionation pattern over the BP and BB fraction in UPW. BSA is a carrier molecule that binds, sequesters and stabilizes small molecules and smaller proteins in a cell. Due to its natural role in binding other compounds, interactions with NOM can likely occur. Shifts to smaller LC-OCD fractions (e.g. the BB fraction), as observed in our study, could indicate hydrolysis of the BSA molecule.

No studies on the biological stability of BSA in drinking water matrices has been performed. A previous study by Sack et al. focused on caseinate, a smaller protein with subunits between 19 and 25 kDa (Sigma Aldrich documentation for casein from bovine milk) and gelatin, a hydrolysis product of collagen that has a size range of 10 to up to 400 kDa (Sack et al., 2014). Both caseinate and gelatin were rapidly used by the drinking-water-related biofilms. Such biofilms did not play a role in our study, suggesting biological degradation is likely less relevant and if present, much slower. However, overall nitrogen limitation of drinking water environments could explain a potential rapid utilization of nitrogenous compounds.

#### 2.4.3 Mono-, di- and triprotic acids show lower recovery rates

The smaller monoprotic acids tested in this study, **acetate** and **benzoate**, follow the expected fractionation (LMWA fraction) on both LC-OCD categories and their molecular characteristics. However, the diprotic **oxalate** and **oxaloacetate** and the triprotic **citrate** were mainly detected (net peak result) in the LMWA fraction, which was expected based on molecular weight, but not on the LC-OCD categorization that states fractionation in the BB fraction.

Small organic acids, such as acetate, oxalate, oxaloacetate and citrate tested in this study can be rapidly degraded by microorganisms. Acetate, for example, boosts general microbial activity and degradation of more complex organic compounds (Sack et al., 2014). Oxalate is for example used as substrate by *Spirillum* sp. NOX that is obtained from tap water (van der Kooij and Hijnen, 1984).

Recent studies by DOC-Labor have shown that organic acids can be lost in the column set-up of the LC-OCD equipment due to microbial degradation by bacteria on the column. Indeed, the current dataset shows evidence that biological degradation of organic acids did take place and thus also affected the outcomes of our validation study. It should be noted that the part of the organic acids that is degraded will, thus, not be detected in the LMWA fraction, but the biodegraded fractions could show up in the HOC fraction. A newly developed system (M9SEMI) uses a 50°C preheating step to avoid microbial activity in the LC-OCD columns. Such a set-up is more promising to better quantify the organic acids in drinking water matrices, because potentially interfering biological activity in the LC-OCD set-up is less likely. However, it might also precipitate some biopolymers and could, therefore, affect the detection and quantification of those compounds.

The application of bioassays like the AOC method in drinking water in the Netherlands have shown that carboxylic acids are normally present at the  $\mu\text{g C/L}$  range. Furthermore, studies in Spain (with chlorinated drinking water that was less intensively treated than Dutch drinking water) and Switzerland (with drinking water quality comparable to Dutch drinking water) using chemical analyses also showed that organic acids are normally only present in drinking water in the  $\mu\text{g C/L}$  range (BTO 2020.032). A short exposure of added carboxylic acids to a drinking water matrix could thus potentially also result in a decrease in the amount of compound that can be detected. However, interactions with the water matrix are biologically relevant when studying interactions with the water matrix. Therefore, a set-up such as the M9SEMI-system could provide an additional advantage that only biological conversions in the water matrix will be detected.

#### 2.4.4 Stearate (and possible palmitate) cannot be measured with the LC-OCD method

The larger monoprotic fatty acid **stearate** showed a low recovery rate, probably due to the strong adsorption of the compound to all surfaces that are used in the experiments. Therefore, it is not feasible to obtain reliable results for stearate. We observed good recovery rates for **palmitate**, which indicates that this larger monoprotic fatty acid can be measured by the LC-OCD method. Further research including fractionation in drinking water matrices is therefore needed to determine whether LC-OCD is capable of measuring larger fatty acids, especially since these compounds come from invertebrates present in drinking water.

Overall, largest peaks were observed in the larger LC-OCD fractions for UPW, but not for both drinking water matrices.

In addition, interactions between organic acids and NOM can affect LC-OCD fractionation in drinking water matrices. A study of Smith and Kramer on the isolation of NOM from water samples by using acid titrations found that multi-site proton interactions are an important feature of NOM (Smith and Kramer, 1999). This supports the potential of organic acids and NOM-fractions to interact and form complexes, which affects fractionation in the LC-OCD analysis. A direct interaction between organic acids or their salt forms and NOM has, however, not been experimentally tested for drinking water matrices.

Overall, molecular characteristics are the steering factor for the fractionation of organic acids in ultrapure water. In drinking water matrices, the interaction between organic acids and NOM as well as microbial activity could lead to partial degradation and the formation of larger complexes of organic compounds, thus resulting in multiple peaks in the LC-OCD chromatogram. The observations in UPW cannot directly be extrapolated to drinking water matrices and further experiments are needed to unravel the interactions between the selected compounds and drinking water matrices.

#### 2.4.5 Amino acids and glucosamine

The **amino acid mix** is composed of a mixture of 17 amino acids and includes both hydrophilic and hydrophobic amino acids. **Tryptophan** was tested separately as the most complex, hydrophobic amino acid. It shows similar patterns to the amino acids mixture. Overall, amino acids were added at low concentrations and showed good recovery rates, with the largest part being present in the LMWN fraction.

## 2.5 Overall challenges and strengths of the LC-OCD method

- The sensitivity and error range of the LC-OCD method plays an important role for the detection of individual compounds in drinking water matrices. Previous studies have indicated that the LC-OCD method has a good reproducibility, replicas show low variation of maximally 5% ([Reproducibility information](#) DOC-Labor, Grefte et al., 2013, personal communication with Karlien Dejaeger & Elien Laforce – UGent, 2022). However, this variation also implies that for regular water matrices with organic matter contents around 1.5 mg C/L, the 5% variation margin equals 75 µg C/L. Therefore, the minimal concentration of compounds to be detected should be >75 µg C/L. 100 µg C/L, therefore, seems to be a feasible target concentration for validation studies in drinking water matrices, although it can also be chosen to be on the safe side and start with concentrations of 200 µg C/L.
- Memory effects can play a role when a compound attaches very well (“sticks”) to the chromatography column. In such a case, measurements need to be repeated. However, in general, this is not an issue with drinking water matrices, since compound concentrations are in the µg C/L range and the column capacity is several orders of magnitude larger. In addition, columns are regularly cleaned with sodium hydroxide (NaOH) as a preventive measure.
- The use of multiple columns does improve the resolution of the LC-OCD method. In the standard set-up two columns are used in series. Also for the new M9SEMI set-up two columns are used in series. The advantage is that for the M9SEMI set-up water is pre-heated to 50°C, which likely prevents microbial degradation of organic compounds on the column. Water with a higher temperature also has a lower viscosity, which improves the resolution of the LC-OCD method.
- Microbial degradation of organic compounds on the LC-OCD chromatography column is a challenge for systems run at room temperature. The novel set-up of the M9SEMI system in which samples are pre-heated to 50°C might provide a solution to this challenge, but this must be investigated.
- The use of different columns can be tested to improve the resolution. However, the testing of different columns by the DOC-Labor over the last decades indicated that the current column set-up provides the best results. The current set-up uses columns with Toyopearl. In addition, for high molecular weight compounds, such as biopolymers, a special set-up can be used. This column makes use of Toyopearl Tosoh TSK-HW65S and HW50S.
- Finally, very recently (July 2022) it was found out that up to May 2022 the biopolymer concentrations reported by Doc-Labor were too low when biopolymer concentrations were higher than 50 µg/L, because the high column pressure shifted part of the biopolymer fraction to the low molecular weight neutral fraction. This error also applies to our samples, where more than 50 µg/L C of biopolymers have been added to the ultrapure water. For those compounds (amylopectin, laminarin and BSA) the results described in the report are less reliable and should be repeated in the future. More importantly, it demonstrates that methods that have not been thoroughly validated and are performed without reliable internal standards should be avoided for drinking water quality analysis.

## 2.6 Conclusions and Perspectives

### 2.6.1 Conclusions

- The LC-OCD method provides a tool to detect and quantify (mixtures of) organic compounds. Based on the error margin of the method obtained in the current study, the detection limit of the different LC-OCD fractions lies probably around 100 µg C/L in water, although further validation studies are required to determine the exact detection limit.

- A general fractionation pattern of individual compounds can be observed in the UPW matrix. When samples are clustered based on the relative concentration over the LC-OCD fractions, compounds with the same chemical properties cluster together.
- The fractionation observations in UPW with compounds added at 100 µg C/L were not observed when compounds were added to two drinking water matrices at 10 µg C/L. It is concluded that concentration differences in LC-OCD fractions of 10 µg C/L are too low to be detected with LC-OCD in drinking water matrices that contain around 1.5 mg C/L DOC.
- Drinking water in the Netherlands contain a mixture of biodegradable organic compounds at concentrations below 10 to 20 µg C/L. Consequently, the LC-OCD method is not sensitive enough to determine (a mixture) of biodegradable organic compounds in drinking water. Nonetheless, during drinking water preparation and purification, especially from surface water, organic carbon concentrations are generally higher. In such settings the LC-OCD method likely provides sufficient resolution.
- Not all compounds end up in the expected LC-OCD fraction. For example, in ultrapure water laminarin was mainly detected in the smaller building blocks fraction, and di- and triprotic acids were mainly detected in the low molecular weight acids fraction. These findings indicate that the LC-OCD categorization is not always appropriate for predicting the fractionation pattern of compounds in ultrapure water, but further validation studies are required.
- Overall, it is concluded that a thorough validation study is required to be able to conclude on the exact value of the LC-OCD method to characterize and quantify NOM and biodegradable organic carbon in drinking water. Such study should also include which internal standards should be included in each LC-OCD run to verify that the run gives reliable results. Before such validation study has been performed, LC-OCD analysis should be avoided or results should be interpreted with great care.

### 2.6.2 Perspectives

- Reports showing the performance of the LC-OCD method in drinking water are missing. Therefore, a detailed and thorough validation study is needed that includes, but is not limited to, the following aspects:
  - Establish the detection limit of the method for different drinking water types for each of the different LC-OCD fractions using individual and mixture of compounds.
  - Validate in which LC-OCD fraction or fractions different organic molecules, that might be important for drinking water, fall to determine whether the current nomenclature for the different LC-OCD fractions is valid.
  - Perform round robin test to determine intra- and interlaboratory variation of the LC-OCD method.
  - Investigate which positive and negative controls should be included with the analysis and determine to which performance characteristics these controls should comply.

A report of the results from such validation studies are required before the LC-OCD method can reliably be implemented in drinking water quality research.

- From the results of this study, it was hypothesized that microbial degradation of individual compounds in the LC-OCD column can result in loss of certain compounds. Besides changing to a set-up in which water is pre-heated and microbial degradation on the LC-OCD column is inhibited, the effects of compound

exposure to different water matrices needs to be tested.

In addition, testing the effects of residence time of compounds in different water matrices can additionally unravel how *in situ* microbial activity in drinking water matrices can affect the LC-OCD outcome.

- The proposed experiments could provide valuable insights into the speed and quantities of chemical and microbial interactions in drinking water matrices. Insights into interfering interactions is furthermore needed to optimize drinking water sampling and storage prior to LC-OCD analysis, to limit the effects of sample treatment on the analysis outcome.
- The hydrophobic organic carbon (HOC) fraction currently is a black box in LC-OCD analyses. Linked to the potential for on-column microbial degradation and the potential of certain compounds to interact with materials on the column, a closer investigation of the HOC fraction is desired. The HOC fraction is a fraction of compounds that is naturally dissolved in drinking water matrices, but only becomes hydrophobic during LC-OCD analysis.

## 3 References

### LC-OCD Bureaustudie

- Almendros, G., Martín, F., & González-Vila, F. J. (1987). Depolymerization and degradation of humic acids with sodium perborate. *Geoderma*, 39(3), 235-247. doi:[https://doi.org/10.1016/0016-7061\(87\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0016-7061(87)90004-8)
- Baghoth, S. A., Dignum, M., Grefte, A., Kroesbergen, J., & Amy, G. L. (2009). Characterization of NOM in a drinking water treatment process train with no disinfectant residual. *Water Supply*, 9(4), 379-386. doi:10.2166/ws.2009.569
- Becker, S., Tebben, J., Coffinet, S., Wiltshire, K., Iversen, M. H., Harder, T., (...) Hehemann, J.-H. (2020). Laminarin is a major molecule in the marine carbon cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(12), 6599-6607. doi:10.1073/pnas.1917001117
- Beckett, R., Jue, Z., & Giddings, J. C. (1987). Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environmental Science & Technology*, 21(3), 289-295. doi:10.1021/es00157a010
- Camper, A. K., Involvement of humic substances in regrowth. *Int J Food Microbiol* 2004, 92 (3), 355-364.
- Glaser, B., Turrión, M. a.-B., & Alef, K. (2004). Amino sugars and muramic acid—biomarkers for soil microbial community structure analysis. *Soil Biology and Biochemistry*, 36(3), 399-407. doi:<https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2003.10.013>
- Grefte, A., Dignum, M., Kroesbergen, J., Rietveld, L.C. Determination of low molecular weight acids by LC-OCD used in drinking water treatment. Chapter 2 of PhD thesis: Removal of Natural Organic Matter Fractions by Anion Exchange – Impact on drinking water treatment processes and biological stability by Grefte, A. (2013).
- Hijnen, W.A.M., Schurer, R., Bahlman, J.A., Ketelaars, H.A.M., Italiaander, R., van der Wal, A., van der Wielen, P.W.J.J. (2018). Slowly biodegradable organic compounds impact the biostability of non-chlorinated drinking water produced from surface water. *Water Research* 129:240-251
- Huber, S. A., Balz, A., Abert, M., & Pronk, W. (2011). Characterisation of aquatic humic and non-humic matter with size-exclusion chromatography--organic carbon detection--organic nitrogen detection (LC-OCD-OND). *Water Res*, 45(2), 879-885. doi:10.1016/j.watres.2010.09.023
- Lipczynska-Kochany, E. (2018). Effect of climate change on humic substances and associated impacts on the quality of surface water and groundwater: A review. *Science of The Total Environment*, 640-641, 1548-1565. doi:<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.376>
- Lovley, D. R., Coates, J. D., Blunt-Harris, E. L., Phillips, E. J. P., & Woodward, J. C. (1996). Humic substances as electron acceptors for microbial respiration. *Nature*, 382(6590), 445-448. doi:10.1038/382445a0
- MacFarlane, R. B. (1978). Molecular weight distribution of humic and fulvic acids of sediments from a north Florida estuary. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 42(10), 1579-1582. doi:[https://doi.org/10.1016/0016-7037\(78\)90028-5](https://doi.org/10.1016/0016-7037(78)90028-5)
- Nikolaou, A. D., Golfopoulos, S. K., Lekkas, T. D., & Kostopoulou, M. N. (2004). DBP Levels in Chlorinated Drinking Water: Effect of Humic Substances. *Environmental Monitoring and Assessment*, 93(1), 301-319. doi:10.1023/B:EMAS.0000016798.53163.43
- Perminova, I. V., Frimmel, F. H., Kudryavtsev, A. V., Kulikova, N. A., Abbt-Braun, G., Hesse, S., & Petrosyan, V. S. (2003). Molecular Weight Characteristics of Humic Substances from Different Environments As Determined by Size Exclusion Chromatography and Their Statistical Evaluation. *Environmental Science & Technology*, 37(11), 2477-2485. doi:10.1021/es0258069
- van Bel, N., van der Wielen, P., Wullings, B., van Rijn, J., van der Mark, E., Ketelaars, H., & Hijnen, W. (2021). *Aeromonas* Species from Nonchlorinated Distribution Systems and Their Competitive Planktonic Growth in Drinking Water. *Appl Environ Microbiol*, 87(5), e02867-02820. doi:10.1128/aem.02867-20

- Xia, S., Gao, B., Li, A., Xiong, J., Ao, Z., & Zhang, C. (2014). Preliminary Characterization, Antioxidant Properties and Production of Chrysolaminarin from Marine Diatom *Odontella aurita*. *Marine Drugs*, 12(9), 4883-4897.

### LC-OCD validation study

- Aryal, R., Yadav, M., Hussain, S., Beecham, S. (2016). Tracking changes in fluorescent organic composition in leachates using excitation emission matrix-parallel factor analysis. *Process Safety and Environmental Protection* 104(B):507-516
- Green, M. M.; Blankenhorn, G.; Hart, H., Which starch fraction is water-soluble, amylose or amylopectin? *Journal of Chemical Education* 1975, 52 (11), 729.
- Hijnen, W.A.M., Schurer, R., Bahlman, J.A., Ketelaars, H.A.M., Italiaander, R., van der Wal, A., van der Wielen, P.W.J.J. (2018). Slowly biodegradable organic compounds impact the biostability of non-chlorinated drinking water produced from surface water. *Water Research* 129:240-251
- van der Kooij, D., Hijnen, W.A.M. (1984). Substrate utilization by an oxalate-consuming *Spirillum* species in relation to its growth in ozonated water. *Applied and Environmental Microbiology*. 47(3):551-559
- Osterberg, R., Lindqvist, I., Mortensen, K. (1993). Particle size of humic acid. *Soil Science Society of America Journal*. 57(1):283-285
- Sack, E.L.W., van der Wielen, P.W.J.J., van der Kooij, D. (2014). Polysaccharides and proteins added to flowing drinking water at microgram-per-liter levels promote the formation of biofilms predominated by Bacteroidetes and proteobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 80(8):2360-2371
- Thurman, E.M., Wershaw, R.L., Malcolm, R.L., Pinckney, D.J. (1982). Molecular size of aquatic humic substances. *Organic Geochemistry* 4(1):27-35

### BTO reports

- van der Wielen P., Vughs, D. (2020). Karakteriseren van biodegradeerbaar organisch koolstof in drinkwater. BTO 2020.032. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, the Netherlands.
- van der Wielen, P.W.J.J. (2018). Aandachtswaarden nieuwe methoden biologische stabiliteit. BTO 2018.049. KWR Water Research Institute, Nieuwegein, the Netherlands.

### Websites

Sigma Aldrich. Casein from bovine milk. [C7078pis.doc \(sigmaaldrich.com\)](https://www.sigmaaldrich.com) Website last visited on 22-11-2021.

# I Bijlagen / appendices

## I.1 Lijst van gebruikte afkortingen

AOC	Assimilable Organic Carbon (assimileerbaar organisch koolstof). Vaak bepaald voor specifieke micro-organismen, AOC-P17: AOC met <i>Pseudomonas fluorescens</i> stam P17 en AOC-NOX: AOC met <i>Spirillum</i> sp. NOX
ATP	Adenosinetriphosphate – adenosinetriphosfaat, de primaire energiedrager van cellen/organismen
BB	Building Blocks – fractie binnen de LC-OCD analyse
BP	Biopolymers – fractie binnen de LC-OCD analyse
BP7	ATP-concentratie bepaald over de eerste 7 dagen van microbiële groei
CDOC	Chromatographic Dissolved Organic Matter – het opgelost organisch koolstof dat van de kolom afkomt en met de LC-OCD methode wordt geanalyseerd
Da	Dalton – een maat voor molecuulgewicht waarbij geldt 1 Da = 1 gram per mol (g/mol)
DOC	Dissolved Organic Carbon – in water opgelost organisch koolstof
DOM	Dissolved Organic Matter – in water opgelost organisch materiaal, hier valt organisch koolstof en overig organisch materiaal (ook stikstof) onder
EPS	Extracellular Polymeric Substances – extracellulair polymere deeltjes, een belangrijk onderdeel van biofilms
FEEM / EEM	Fluorescence Excitation Emission Matrix – fluorescente excitatie-emissie-matrix waarmee de globale samenstelling van organisch materiaal bepaald kan worden
FFF	Flow Field-flow Fractionation – fractionering op basis van laminaire flow en cross flow
FPOM	Fine Particulate Organic Matter – fijn organisch materiaal << 500µm
HS	Humic Substances – fractie binnen de LC-OCD analyse
HOC	Hydrophobic Organic Carbon – hydrofoob organisch materiaal
IC	Inorganic Colloids – niet-organische (ofwel anorganische) deeltjes
LC-(HR)MS	Liquid Chromatography-(High Resolution) Mass Spectrometry – vloeistofchromatografische scheiding gekoppeld aan de identificatie, kwantificatie en bepaling van de lading van stoffen; met HRMS wordt dit op zeer hoge resolutie uitgevoerd
LC-OCD	Liquid Chromatography – Organic Carbon Detection
LMW(O)A	Low Molecular Weight (Organic) Acids – fractie binnen de LC-OCD analyse
LMWN	Low Molecular Weight Neutrals – fractie binnen de LC-OCD analyse
MF	Membrane Filtration – membraanfiltratie
NMR	Nuclear Magnetic Resonance – techniek waarmee de atomaire samenstelling van stoffen kan worden vastgesteld
NOM	Natural Organic Matter (natuurlijk organisch materiaal)
OND	Organic Nitrogen Detection – bepaling voor de hoeveelheid organisch stikstof (nitraat, nitriet en ammonium)
PHMOC	Particulate High Molecular Organic Carbon (deeltjes hoogmoleculair organisch koolstof)
POC	Particulate Organic Carbon – organisch koolstof dat voorkomt als deeltjes
POM	Particulate Organic Matter – organisch materiaal dat voorkomt als deeltjes >500 µm, hier valt organisch koolstof en ander organisch materiaal (ook stikstof) onder
RSF	Rapid Sand Filtration – snelle zandfiltratie
SAC	Spectral Absorption Coefficient – spectrale absorptiecoëfficiënt bij een bepaalde golflengte licht, in de praktijk vaak UV-licht met een golflengte van 254 nanometer (zie ook SUVA).
SEC	Size Exclusion Chromatography – chromatografische kolomscheiding op basis van molecuulgrootte
SOA	Small Organic Acids – methode om de hoeveelheid kleine organische zuren te kwantificeren
SUVA	Specific UV Absorption – de specifieke UV-absorptie van organisch materiaal, meestal bepaald met ultraviolet licht met een golflengte van 254 nanometer.
TEP / cTEP	Transparent Exopolymer Particles / colloidal TEP – transparante exopolymeer-deeltjes, al dan niet deeltjesvormend/colloïdaal
TOC	Total Organic Carbon – het totaal aan organisch koolstof



UV Ultraviolet – licht van zeer korte golflengte (100-400 nm)

## I.II Appendices validation study

Table. Overview of the additional parameters determined in the LC-OCD analysis with KWR drinking water. These parameters include total dissolved organic carbon (DOC), hydrophobic organic carbon (HOC), chromatographic dissolved organic carbon (CDOC), nitrate (NO<sub>3</sub>-), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), inorganic colloids (IC) and specific UV absorbance at 254 nm divided by the DOC (SAC/DOC=SUVA). The Net DOC is calculated by subtracting the Blank DOC from the total DOC for each solution. 0\* indicates the net measurement was below zero.

Compound ↓ Parameter →	DOC	Net DOC	HOC	CDOC	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	IC	SUVA
Amylopectin	1676	0*	13	1663 (99%)	>689	1	<0.01	4.08
Laminarin	1778	96	67	1711 (96%)	<1	<1	<0.01	4.04
BSA	1722	40	14	1706 (99%)	<1	<1	<0.01	4.13
Oxalate	1779	97	77	1702 (96%)	<1	<1	<0.01	4
Oxaloacetic acid	1747	65	46	1701 (97%)	<1	<1	0.02	4.09
Citrate	1729	47	162	1567 (91%)	<1	<1	<0.01	4.04
Acetate	1719	37	67	1653 (96%)	<1	<1	<0.01	4.19
Benzoate	1707	25	40	1667 (98%)	<1	<1	<0.01	4.09
Palmitate	1771	89	43	1727 (98%)	<1	<1	<0.01	3.96
Stearate	1726	44	80	1646 (95%)	<1	<1	<0.01	4.15
Amino acid mix	1709	27	40	1670 (98%)	<1	<1	<0.01	4.1
Tryptophan	1719	37	39	1680 (98%)	<1	<1	<0.01	4.18
Glucosamine	1741	59	47	1694 (97%)	>412	16	<0.01	4.01
Blank	1682		17	1665 (99%)	>396	<1	<0.01	4.23
<b>Average ±sd</b>	<b>1729 ±32</b>	<b>55 ±26</b>	<b>54 ±38</b>	<b>1675 ±39</b>		<b>9 ±11</b>		<b>4.09 ±0.08</b>

Table. Overview of the additional parameters determined in the LC-OCD analysis with BPL drinking water. These parameters include total dissolved organic carbon (DOC), hydrophobic organic carbon (HOC), chromatographic dissolved organic carbon (CDOC), nitrate (NO<sub>3</sub>-), ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>), inorganic colloids (IC) and specific UV absorbance at 254 nm divided by the DOC (SAC/DOC=SUVA). The Net DOC is calculated by subtracting the Blank DOC from the total DOC for each solution. 0\* indicates the net measurement was below zero.

Compound ↓ Parameter →	DOC	Net DOC	HOC	CDOC	NO <sub>3</sub>	NH <sub>4</sub>	IC	SUVA
Amylopectin	1521	17	18	1503 (99%)	>382	<1	<0.01	2.43
Laminarin	1535	31	<1	1535 (100%)	>401	<1	0.02	2.48
BSA	1518	14	<1	1518 (100%)	>390	<1	<0.01	2.53
Oxalate	1526	22	<1	1526 (100%)	1829	<1	<0.01	2.48
Oxaloacetic acid	1518	14	<1	1518 (100%)	1827	<1	0.01	2.46
Citrate	1529	25	<1	1529 (100%)	1833	<1	0.02	2.4
Acetate	1549	45	<1	1549 (100%)	1815	<1	<0.01	2.45
Benzoate	1541	37	<1	1541 (100%)	?	?	0.02	2.42
Palmitate	1531	27	<1	1531 (100%)	?	?	0.02	2.53
Stearate	1525	21	<1	1525 (100%)	?	?	0.02	2.39
Amino acid mix	1537	33	<1	1537 (100%)	?	?	0.02	2.46
Tryptophan	1538	34	<1	1538 (100%)	?	?	0.03	2.46
Glucosamine	1532	28	<1	1532 (100%)	?	?	<0.01	2.45
Blank	1504	0	<1	1504 (100%)	?	?	<0.01	2.5
<b>Average ±sd</b>	<b>1529 ±11</b>	<b>25 ±11</b>		<b>1528 ±13</b>	<b>1826 ±8</b>		<b>0.02 ±0.01</b>	<b>2.46 ±0.04</b>

Table. Overview of the target concentration calculations for 10 µg C/L (drinking water) and 100 µg C/L (ultrapure water) based on the molecular weight of carbon in the compound formula.

\*The standard formula for bovine serum albumin is used

\*\*110 g/mol is used as the documented average molecular weight.

\*\*\*The basic formula for amino acids with R indicating the amino acid specific and characteristic side chain.

Compound	MW	Solubility	Formula	MW C	MW H+N+O +Na+Cl	(MW C)/(MW total)	µg/l for 10 µg C/L	µg/l for 100 µg C/L
Amylopectin	40000000	Soluble	C <sub>30</sub> H <sub>52</sub> O <sub>26</sub>	360.3	468.4	0.43	23	230
Laminarin from Laminaria digitata	13000	Soluble: 10 g/L	C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> O <sub>16</sub>	216.2	288.2	0.43	23.3	233.3
Bovine Serum Albumin (BSA)	66430	Soluble: 40 g/L	C <sub>123</sub> H <sub>193</sub> N <sub>35</sub> O <sub>37</sub> *	1477.3	1276.7	0.54	18.6	186.4
Sodium oxalate	134	Soluble: 37 g/L	Na <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	24	110	0.18	55.8	557.8
Oxaloacetic acid	132.07	Soluble: 100 g/L	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>5</sub>	48	84	0.36	27.5	274.9
Sodium citrate monobasic	214.11	Soluble: 435 g/L	NaC <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub>	72.1	140	0.34	29.4	294.3
Sodium acetate	82.03	Soluble: 1233 g/L	C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	24	58	0.29	34.1	341.5
Sodium benzoate	144.1	Soluble: >628 g/L	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>2</sub>	84.1	60	0.58	17.1	171.4
Sodium palmitate	278.41	Relatively insoluble: 0.719 g/L	C <sub>16</sub> H <sub>31</sub> NaO <sub>2</sub>	192.2	86.2	0.69	14.5	144.9
Sodium stearate	306.46	Insoluble: 0.0029 g/L	C <sub>18</sub> H <sub>35</sub> NaO <sub>2</sub>	216.2	90.3	0.71	14.2	141.8
Amino Acid Standard	110**	Soluble	R-C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>2</sub> ***	24	50	0.32	30.8	308.3
DL-Tryptophan	204.23	Soluble	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	132.1	72.1	0.65	15.5	154.6
D-(+)-Glucosamine hydrochloride	215.63	Soluble	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> ClNO <sub>5</sub>	72.1	143.6	0.33	29.9	299.2

Table. Calculations of the added concentration for the amino acid standard. Calculations were performed with the average molecular weight of the amino acids in the mixture: 136.64 g/mol and the defined concentration of the amino acids in the mixture: 2.5 µmol/ml and HCl: 100 µmol/ml. AA = amino acids.

Target concentration	100 µg C/L	10 µg C/L
µgrams of standard added to 1L	308.30	30.83
µL of standard added to 1L	285.44	28.54
ml of standard added to 1L	0.29	0.03
µmol/ml AA in standard	2.5	2.5
µmol/ml HCl in standard	100	100
µmol AA in added amount	0.714	0.071
µg AA in added amount	97.51	9.75
% C in AA	0.32	0.32
µg C	31.20	3.12

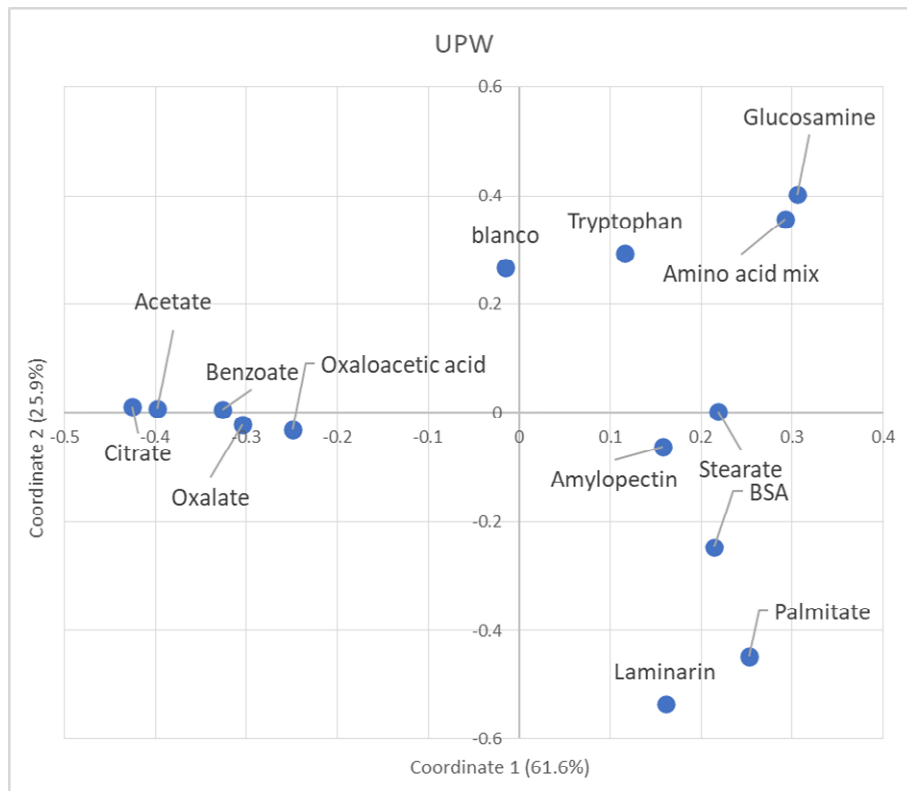


Figure PCoA plot with Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of the raw LC-OCD data for the ultrapure water (UPW).

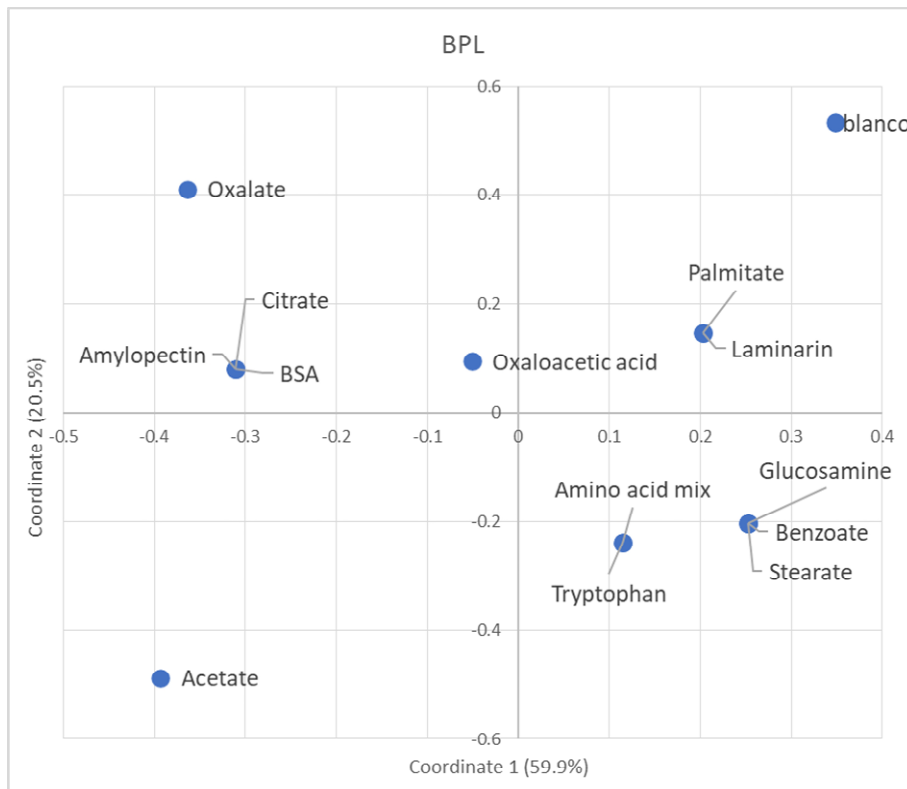


Figure PCoA plot with Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of the raw LC-OCD data for Berenplaat drinking water (BPL).

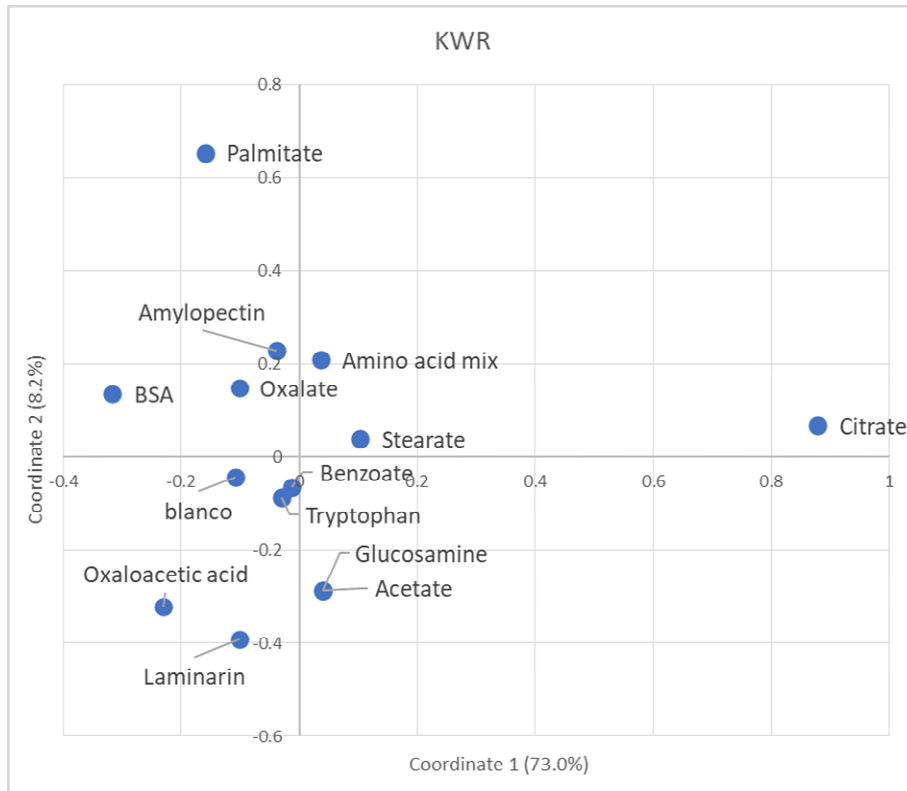


Figure PCoA plot with Bray-Curtis dissimilarity of the relative abundance of the raw LC-OCD data for KWR drinking water (BPL).