

La spéciation métallique : son importance et ses différentes méthodes de détermination

Dr. Ghiasse Abbasse*
Dr. Hassan wassouf**

(Déposé le 13 / 10 / 2007. Accepté 2/12/2007)

□ Résumé □

Le concept de spéciation est le fait de créer des méthodes d'analyse permettant de remplacer la mesure de la concentration totale d'un élément dans un échantillon par sa spéciation, c'est-à-dire, l'identification et l'évaluation de toutes les formes de cet élément dans un échantillon. Ce terme est utilisé maintenant en chimie de l'environnement, écotoxicologie et toxicologie. Donc, dans ce travail nous allons montrer l'importance de la spéciation, séparer certains éléments dissous dans l'eau de mer selon la taille en utilisant deux filtres 0.2 μm et 0.45 μm puis la détermination de la fraction organique et inorganique pour chaque filtre. Les résultats ont montré qu'il y a une bonne différence entre les deux types de filtration et cela se manifeste aussi pour la fraction organique et inorganique des métaux étudiés.

Mots clés: Spéciation, éléments Métallique, concentration organique, Inorganique, concentration, eau de mer, eau de rivière, eau d'estuaire

* Enseignant, département de chimie marine, Institut Supérieur de Recherches Marines, Université Tichrine, Lattaquié, Syrie

**Enseignant, département de chimie, faculté des Sciences, Université Tichrine, Lattaquié, Syrie

التوزع الشكلي للمعادن: أهميته وطرائق التحديد المختلفة

* الدكتور غياث عباس

**الدكتور حسن وسوف*

(تاريخ الإيداع 13 / 10 / 2008. قُبِلَ للنشر في 2008/12/2)

□ الملخص □

إن مفهوم التوزع الشكلي يعني؛ إيجاد طرائق تحليل بحيث نتمكن من تحديد التركيز الشكلي لجميع أشكال عنصر ما في وسطه بدلاً من تحديد التركيز الكلي لهذا العنصر. هذا يعني: فصل وتحديد وتقييم جميع الأشكال الكيميائية لعنصر ما في عينة مدروسة. يستخدم مصطلح التوزع الشكلي الآن في مجالات عديدة منها: الكيمياء البيئية، وكيمياء التسمم، والتسمم الحيوي، لذلك سوف نوضح في هذا المقال أهمية هذا المصطلح، ومن ثم سوف نقوم بفصل بعض العناصر من المياه البحرية حسب قياس أبعادها باستخدام مرشحين 0.2 و 0.45 ميكرومتر، ومن ثم تحديد الشكل العضوي، واللاعضوي لهذه العناصر -الخاص بكل عملية ترشيح. وقد أظهرت النتائج فروقات واضحة في تراكيز العناصر الناتجة عن نوعي الترشيح المستخدمين وهذا تجلّى أيضاً في تراكيز الشكل العضوي، واللاعضوي للعناصر المدروسة.

الكلمات المفتاحية: التوزع الشكلي، العناصر المعدنية، التركيز العضوي، التركيز اللاعضوي، المياه البحرية، المياه النهرية، المياه المصبية.

*مدرس - قسم الكيمياء البحرية- المعهد العالي للبحوث البحرية- جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

**مدرس - قسم الكيمياء - كلية العلوم- جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

Introduction :

La distribution, mobilité, biodisponibilité, toxicité, bio-accumulation, et la biodégradation des éléments chimiques, ne dépendent pas seulement de leurs concentrations, mais aussi de leurs états dans les systèmes naturels [1-3]. La mobilité d'un métal est également un paramètre de première importance, qui influence sa distribution dans les différents compartiments (sédiments, eaux ou atmosphère) et sa vitesse de transport [4]. Pour de nombreux métaux (ex.: Cd, Cu, Pb, Zn), la réponse biologique provoquée par le métal dissous dépend de la concentration de l'ion métallique libre M^{n+} [5]. Pour un organisme aquatique donné, les effets biologiques d'un métal dissous vont également dépendre de divers autres facteurs environnementaux (ex: pH, dureté [Ca], alcalinité, concentration et nature de la matière organique dissoute). Ces facteurs peuvent en principe agir de deux manières : directement sur l'organisme, en influant sur sa physiologie et donc sa sensibilité au métal, ou indirectement, en influençant notamment la spéciation du métal dans le milieu [6-7]. Les métaux présents dans le milieu aquatique peuvent subir des changements de phase, passant par exemple de la phase dissoute à la phase solide par adsorption sur les particules en suspension. Ils peuvent également subir des changements d'état d'oxydation soit par le biais de processus chimiques (e.g. par photo-réduction) ou de processus biologiques (e.g. par l'action d'enzymes provenant du phytoplancton ou des microorganismes). Donc la spéciation des éléments occupe une bonne place dans la chimie de l'environnement [8]. De façon générale, l'étude de la spéciation est basée sur:

1. la détermination des différentes formes chimiques d'un métal dans son milieu (aqueux, solide,...).

2. la méthode analytique mise en œuvre pour la détermination des formes chimiques du métal.

Ces déterminations nécessitent souvent un prétraitement très soigné et une étape de séparation et de pré-concentration plus importante.

Ainsi les chimistes qui travaillent sur les éléments métalliques essaient actuellement de répondre aux deux questions suivantes :

- Quelles sont les formes chimiques dans lesquelles les métaux se trouvent dans les échantillons ?
- Quelle est la concentration de chaque forme du métal et son effet sur les différents milieux naturels ?

La répartition du métal en ses différentes formes chimiques en phase dissoute peut être déterminée par calcul. Ces calculs sont basés sur l'utilisation des constantes d'équilibres des complexes susceptibles d'être présents dans le milieu étudié, ainsi que les concentrations totales des espèces considérées [9-10]. Mais ces constantes de stabilité dépendent des conditions dans lesquelles les métaux se trouvent dans leurs milieux naturels, comme par exemple la température, la salinité et la force ionique. De plus, certains complexes sont à des concentrations extrêmement faibles, et ils se trouvent souvent instables, ce qui empêche la détermination des concentrations réelles de ces complexes, et rend cette méthode de calcul moins représentative et plus délicate à mettre en œuvre.

But et importance de la recherche :

Le but de ce travail est de savoir que les métaux se trouvent dans l'eau de mer en plusieurs tailles selon la composition de l'eau de mer, et cela est très important au niveau d'accumulation des ions métalliques dans les organismes vivants. De plus, nous allons

étudiés la répartition des métaux en forme organique et inorganique, car l'accumulation des ions métalliques dépend de la forme chimique surtout la forme inorganique et la forme mobile.

Matériels et méthodes :

En vue d'analyser les métaux traces dans les eaux de mer, nous avons utilisé le 8-Hydroxyquinoline (8-HQ), qui a été ajouté séparément aux échantillons d'eau de mer puis la fixation sur les colonnes C18 qui retient les complexes M-8-HQ.

Le protocole analytique a été comme suivant :

-1000 ml de l'eau de mer a été séparément filtré en utilisant un filtre 0.2 μm .

-1000 ml de l'eau de mer a été séparément filtré en utilisant un filtre 0.45 μm .

- chaque volume a été divisé en deux parties (500 ml), la première a été traitée par la 8-HQ puis passée sur la colonne C18, où dans ce cas nous pouvons déterminer la concentration totale des métaux, et la deuxième partie a été directement passée sur la colonne C18 où nous déterminons la fraction des métaux liée aux matières organiques naturelles. Les métaux qui sont fixés sur la colonne C18 ont été retirés par 10 ml d'acide nitrique (2M), puis l'acide a été analysé par la technique d'absorption atomique (VARIAN-220, technique de la flamme) pour déterminer les concentrations métalliques.

La fraction inorganique a été obtenue par la différence entre la fraction totale et la fraction organique. Ce protocole a été appliqué à des échantillons de l'eau de mer prélevés des différentes profondeurs 1 m ; 2 m ; 3 m.

Résultats et discussions :

1- Les formes chimiques d'un métal dans les milieux aquatiques :

Les métaux se trouvent sous différentes formes chimiques dans les différents compartiments environnementaux, par exemple, le Hg, Pb, As et Se sont sous plusieurs formes volatiles et sont présents dans des matrices solides (sédiments, sols) ou liquides. Dans les systèmes aquatiques, les métaux se trouvent sous formes des ions hydratés ou liés aux complexes organiques et inorganiques. Chlorure, carbonate, sulfate, hydroxyle et fluorure sont les principaux ligands inorganiques qui se trouvent en concentrations élevées dans les milieux aquatiques (10^{-3} - 10^{-5} M). Les complexes formés entre les ligands inorganiques et les métaux traces ont souvent des constantes de stabilité relativement faibles et les métaux ainsi complexés sont appelés métaux sous formes mobiles ou labiles. Selon [11], les complexes inorganiques les plus utilisés dans les calculs de spéciation dans les milieux aquatiques naturels sont :

Cr: $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$; $\text{Cr}(\text{OH})_3$; $\text{Cr}(\text{OH})_4^-$; $\text{Cr}(\text{OH})_2$; HCrO_4^- ; CrO_4^{2-}

Fe: Fe^{2+} ; $\text{Fe}(\text{OH})_3$; FeCO_3 ; FeS_2 ; FeS ; $\text{Fe}(\text{OH})_2^+$; $\text{Fe}(\text{OH})_4^-$; FeSO_4
 Fe_3O_4 ; Fe_2O_3 ; FePO_4 ; $\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2$; FeCl ; Fe-silicates

Mn: Mn^{2+} ; MnS ; MnCl^+ ; MnCO_3 ; $\text{Mn}(\text{OH})_2$; MnO_2

Ni: Ni^{2+} ; NiS ; NiCl^+ ; NiSO_4 ; $\text{Ni}(\text{OH})_2$

Cu: Cu^{2+} ; CuS ; CuO ; $\text{Cu}(\text{OH})_2$; $\text{Cu}(\text{OH})^+$; CuFeS_2 ; $\text{Cu}_2\text{CO}_3(\text{OH})_2$
 $\text{Cu}_3(\text{CO}_3)_2(\text{OH})_2$; CuCO_3

Zn: Zn^{2+} ; ZnS ; ZnSO_4 ; $\text{Zn}(\text{OH})^+$; ZnCl^+ ; ZnSO_3 ; ZnCO_3

Pb: Pb^{2+} ; PbS ; PbCl^+ ; PbCl_2 ; PbCl_3 ; PbCO_3 ; $\text{Pb}(\text{OH})^+$; $\text{Pb}(\text{OH})_2$; PbO_2

Cd: Cd^{2+} ; CdCl^+ ; CdCl_2 ; CdCl_3 ; CdS ; $\text{Cd}(\text{HS})^+$; $\text{Cd}(\text{HS})_2$; $\text{Cd}(\text{HS})_3^-$; $\text{Cd}(\text{OH})^+$
 $\text{Cd}(\text{OH})_2$; $\text{Cd}(\text{HS})_4^{2-}$; CdCO_3

Dans notre travail, nous avons transformé toutes les concentrations métalliques en forme organique par l'addition de 8-HQ puis leurs fixation sur la colonne C18, les résultats sont présentés dans la figure 1 où nous montrons la différence entre les concentrations métalliques en utilisant deux filtres 0.2 μm et 0.45 μm dans des échantillons marins prélevés des trois profondeurs 1 m ; 2 m ; 3 m. Ces résultats montrent que les métaux se trouvent dans le milieu marin sur plusieurs tailles car il est très évident qu'il y a une diminution des concentrations pour tous les métaux qui sont filtrés sur 0.2 μm . Ce qui met en évidence l'étude de la spéciation métallique selon plusieurs échelles pour savoir qu'elle est la forme la plus mobile et ce qui s'accumule dans les cellules des organismes aquatiques.

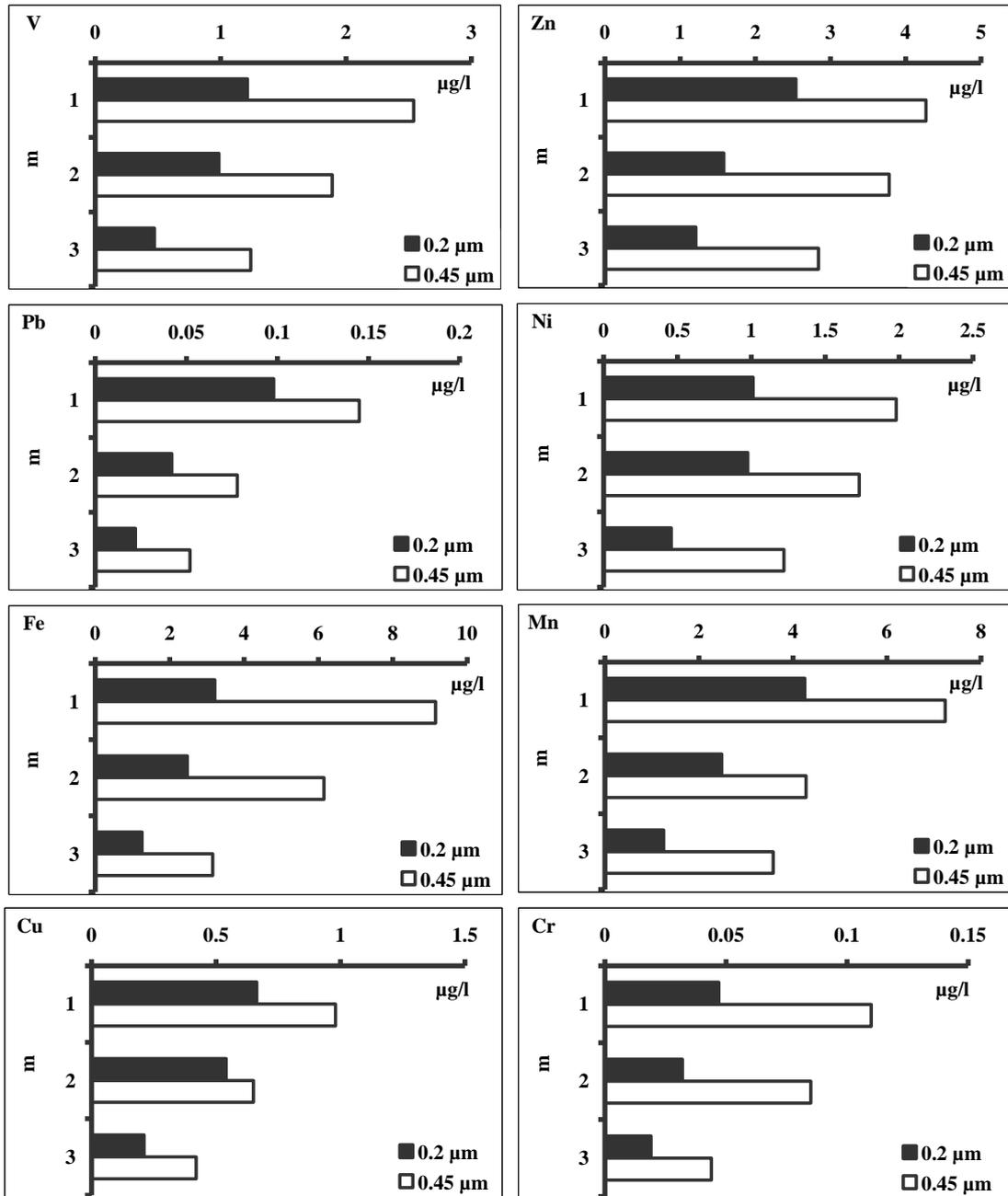


Figure (1) : la concentration des métaux totaux dans des échantillons marins prélevés des profondeurs 1 m ; 2 m ; 3 m et filtrés sur 0.2 μm ; 0.45 μm .

2- Relation : métal – matière organique

Pour déterminer la concentration des métaux liés à la matière organique naturelle, nous avons utilisé la colonne C18 qui fixe ces métaux, les résultats sont présentés dans la figure 2, où nous remarquons une diminution des concentrations sur le filtre 0.2 μm , cela s'agit qu'il y a une partie des métaux liés aux matières organiques qui ne passe pas à travers ce filtre. La même chose pour les concentrations des métaux qui sont liés aux matières inorganiques (figure 3), car ces valeurs sont liées aux celles des concentrations totales et organiques.

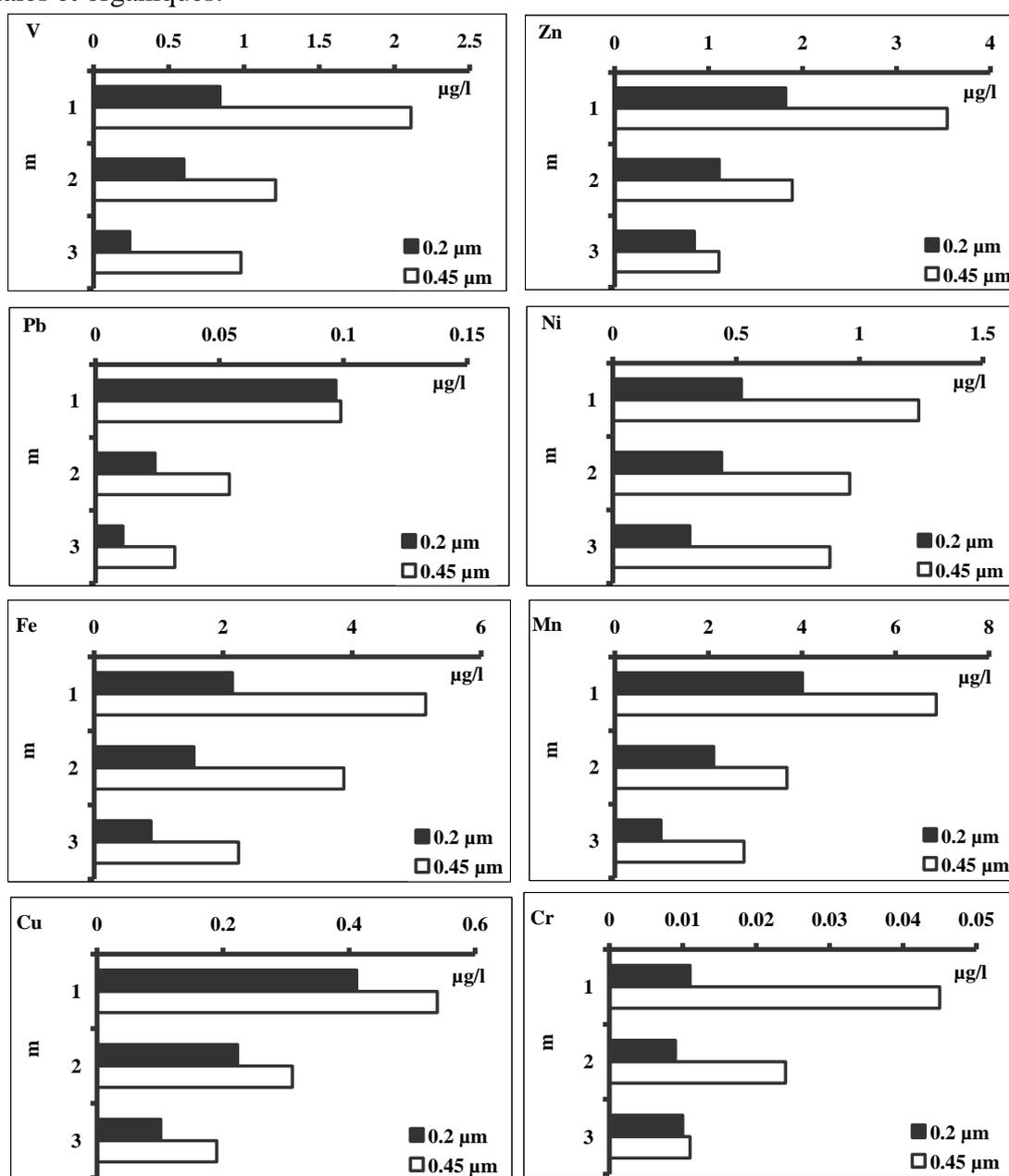


Figure (2) : la concentration des métaux liés aux matières organiques dans des échantillons marins prélevés des profondeurs 1 m ; 2 m ; 3 m et filtrés sur 0.2 μm ; 0.45 μm .

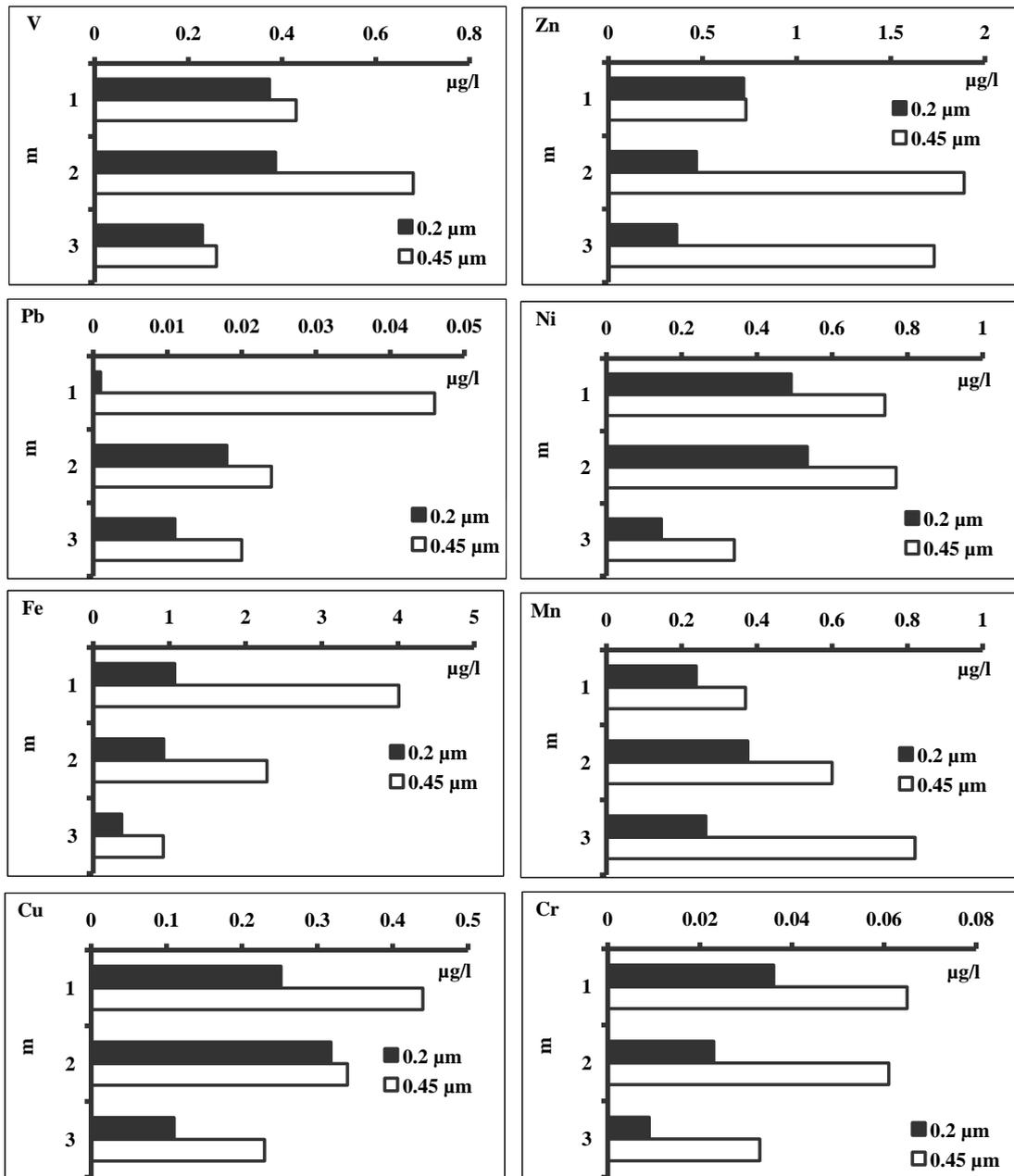


Figure (3) : la concentration des métaux liés aux matières inorganiques dans des échantillons marins prélevés des profondeurs 1 m ; 2 m ; 3 m et filtrés sur 0.2 µm ; 0.45 µm .

Pour interpréter les résultats précédents, il est nécessaire d'avoir une idée sur la relation entre les ions métalliques et les matières organiques dans le milieu marin.

La matière organique dissoute (MOD) joue un rôle important dans le milieu aquatique, elle est impliquée dans les cycles biologiques, influe sur les transformations chimiques qui se produisent dans ces milieux, et peut aussi interagir avec les substances minérales. Sa composition est très hétérogène et dépend des circonstances géographiques, climatiques, physiques et biologiques de sa formation.

Si l'importance de la matière organique dans les cycles biogéochimiques inhérents au milieu aquatique est maintenant reconnue, son comportement dans les différents écosystèmes marins n'a été que partiellement étudié [12]. Le milieu marin côtier et plus

particulièrement les estuaires sont des lieux privilégiés par lesquels s'effectue le transfert de la matière organique des sols et des rivières vers l'océan. Dans ces zones d'interface : eau douce – eau de mer, il existe non seulement des processus de dilution mais également des phénomènes souvent complexes de floculation et de précipitation. Par ailleurs, étant souvent très productifs, les systèmes estuariens constituent une source importante des matières organiques. Les matières organiques dans les systèmes aquatiques ont des origines différentes, principalement la dégradation des organismes vivants, les processus d'oxydation des algues, et les sources de la pollution anthropique. Pour simplifier, les matières organiques sont divisées en trois groupes :

1) La matière organique simple, elle inclut des composés bien caractérisés, qu'il est possible de classer dans des familles chimiques bien définies : glucides, lipides, protéines, pigments... Ces composés de faible masse molaire sont rapidement dégradés par des microorganismes, et ont une durée de vie courte.

2) La matière organique complexe, elle est principalement constituée des substances humiques (SH). Ces substances humiques sont une classe de composés organiques de grande importance, car ils résistent à la dégradation bactérienne et peuvent former des complexes stables avec les ions et les hydroxydes métalliques [13]

3) Les matières organiques colloïdales : plusieurs auteurs ont affirmé l'importance de la matière colloïdale dans la complexation des métaux [14]. Ces auteurs ont trouvé entre 30-67 % du carbone organique dissous sous formes colloïdes dans plusieurs zone au monde ; la taille de ces composés est située entre (1nm) et 0,45 μm .

Les substances humiques (SH) constituent la fraction organique principale dans le milieu aquatique. Elles arrivent à ce milieu par la dégradation des matières vivantes. Ces substances sont des mélanges des polymères organiques avec différentes groupes hydrophyliques chargés et hydrophobiques, et contiennent des groupes fonctionnelles comme -COOH, -NH₂, -OH, -SH, aux propriétés variées[1-2]. Ces macromolécules sont des composés réfractaires, de caractère acide ou amphotère. L'importance de la présence des substances humiques vient, d'une part, du fait qu'elles peuvent représenter jusqu'au 2/3 de la matière organique, et d'autre part de pouvoir complexer les éléments métalliques. Dans l'eau de mer, la matière organique dissoute est présente à des concentrations entre 0,1 mg/L. Dans l'eau douce, la concentration peut atteindre 10 mg/L, par contre dans certains milieux comme l'eau interstitielle et les eaux côtières la concentration peut avoisiner 150 mg/L [15]. Donc la formation des complexes organiques avec les ions métalliques devient très importante.

Avant d'évaluer l'importance des interactions matières organiques-métaux dans les eaux naturelles, certains chercheurs proposent de rechercher les trois paramètres suivants : (a) la détermination de la concentration des substances organiques présentes dans le milieu, (b) la caractérisation de la nature moléculaire de ces substances, et (c) l'interprétation des principales interactions des classes organiques prédominantes avec les métaux lourds. Ces paramètres exigent le plus souvent la détermination des constantes de stabilité pour les différents complexes organométalliques et la détermination de la capacité complexante du milieu ([16]. En effet, la détermination des concentrations et les natures des différents ligands organiques et certains cas les ligands inorganiques dans certains milieux aquatiques comme le milieu marin est très difficile et elle est le plus souvent approximative, car certain de ces ligands se trouvent à des concentrations très faibles et la plupart des mesures et traitements analytiques se font après le prélèvement (*ex-situ*) ce qui conduiraient à des

modifications et des changements sur les formes chimiques de certaines espèces chimiques.

L'influence des substances organiques sur la distribution des métaux en solution comporte plusieurs aspects : les molécules organiques ont une action complexante sur les métaux ce qui augmente généralement leur solubilité, elles changent la distribution entre les formes oxydées et réduites, et elles atténuent la toxicité de certains métaux en modifiant leur disponibilité pour les organismes aquatiques. En général, on peut distinguer deux principales interactions entre les matières organiques et les métaux en traces :

A- En effet, dans la mesure où la toxicité d'un métal est principalement due à sa forme libre hydratée $[M(H_2O)_p]^{n+}$, la présence des ligands complexants, tant organiques que minéraux (inclus les matières colloïdales à caractère organique) conduit à une forte diminution de cette toxicité [17]. Mais dans certains cas, les composés organométalliques sont plus toxiques que les complexes inorganiques pour le même métal, par exemple, les composés organiques du mercure, du plomb et de l'étain sont plus toxiques que leurs formes inorganiques. Cette toxicité varie selon l'organisme, par exemple, le tri-éthyl étain est très toxique pour les mammifères, le tri-méthyle étain est toxique pour les insectes, et le tri-butyl étain ou le méthyl mercure sont toxiques pour les poissons et les bactéries [18].

B- Les matières organiques jouent aussi un rôle dans les phénomènes d'adsorption des éléments sur les matières en suspension et influencent la stabilité des colloïdes [19]. Dans le cas des substances humiques, les groupes oxygénés: COOH, C = O, OH phénoliques, ainsi que les groupes amines et imines sont responsables de la formation des complexes solubles ou insolubles avec les différents cations métalliques. Plusieurs travaux ont mis en évidence la complexation de certains métaux à l'état de traces par les matières organiques dissoutes ou en suspension dans les eaux naturelles [20-21].

L'étude de la spéciation et des constantes de stabilité des différents complexes humato- métalliques montre que la complexation dépend du métal étudié, des conditions opératoires, du type de la fraction humique choisie et de son origine. Mantoura et al., [22] trouvent que les constantes de stabilité des différents complexes des humates suivent, à pH 8, l'ordre: Hg > Cu > Ni = Zn > Co > Mn = Cd > Ca > Mg.

Bien que les substances humiques forment des complexes moins stables avec le calcium et le magnésium qu'avec les métaux de transition (Tableau 1), Mantoura et al., (1978) [22] ; Kerndorff et al., 1980 [23] trouvent que 24,1 % des substances humiques du lac de Celyn sont sous formes humates de calcium et de magnésium, et que 73,2 % de ces substances ne participeraient pas à des réactions de complexation. Le manganèse, le chrome, et le zinc seraient complexés dans des proportions voisines (respectivement 5,4 %, 5,7 % et 8,2 %), par contre, seulement 2,5 % de substances humiques sont engagées dans des complexes humato- cuivriques et humato – mercuriels.

Tableau 1 : Logarithmes des constantes de stabilité des humates de Ca, Mg, Mn, Co, Cu, Zn, Hg, (20 °C, pH = 8,0 ; I = 0,02) d'après Mantoura et al., 1978.

Elément	Ca	Mg	Mn	Co	Cu	Zn	Hg
log K	3,6 – 4,12	3,5 – 3,98	4,45 – 4,51	4,79 – 4,83	8,89 – 9,71	5,27 – 5,31	18,0 – 18,1

Conclusion :

L'étude de la distribution des formes chimiques d'un métal dans les différents milieux environnementaux est plus importante que l'étude des teneurs métalliques totaux si l'on veut comprendre le comportement des métaux dans l'environnement. La complexation des métaux dans les eaux naturelles est attribuée à deux types de ligands : organiques et inorganiques. Les ligands inorganiques susceptibles d'intervenir dans les eaux sont en nombre limité; il s'agit notamment de OH^- , HCO_3^- , CO_3^{2-} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- et SiO_4^{4-} et bien d'autre ligands qui sont moins communs, sans négliger l'éventuelle présence des autres complexants liés à une pollution locale circonstancielle. Quant aux matières organiques complexantes ou chélatantes, distinguent entre les composés d'origine naturelle (matières humiques, acides aminés, hydrates de carbone) et ceux qui ont été introduits dans le milieu par l'activité humaine (acides aminocarboxyliques et leurs dérivés des acides sulfuriques et détergents).

Références :

- 1- ZOLOTOV, Y.A ; KUZ'MIN, N..M. *Preconcentration of trace elements*. Wilson & Wilson'S, Comprehensive Analytical Chemistry XXV, 1990, 23.
- 2- ZOLOTOV, Y. A; IVANOV, V. M. ; AELIN, V.G. *Chemical test- Methods of analysis*. Wilson & Wilson's. Comprehensive Analytical Chemistry, Barcelon XXXVI., 2002,450.
- 3- ZIRINO, A. ; YAMAMOTO, S. *pH-dependent model for the chemical speciation of copper, zinc, cadmium, and lead in sea water*. limnol. oceanogr 17,1972, 661-671.
- 4- WELLS, M. L; SMITH, G. J. ; BRULAND, K. W. *The distribution of colloidal and particulate bioactive metals in Narragansett Bay RI*. Marine Chemistry, 71, 2000, 143-163.
- 5- VOELKER, B. M. ; KOGUT, M. B. *Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case*. Marine Chemistry,74, 2001, 303-318.
- 6- TIPPING, E ; LAWLOR, A. J. *Modelling the chemical speciation of trace metals in the surface waters of the Humber system*. The Science of the Total Environment 210/211, 1998, 63-77.
- 7- PESAVENTO, M; MAGI, E. *Investigation of the metal species in seawater by sorption of the metal ion on complexing resins with sorbing properties*. Analytica Chimica Acta, 449, 2001, 23-33.
- 8- PÉREZ-BENDITO,D. ; RUBIO, S. *Environmental Analytical Chemistry*. WILSON & WILSON'S, Comprehensive Analytical Chemistry XXXII, 1999, 450.
- 9- NOLTING, R. F.; DALEN, M.V. ; HELDER,W. *Distribution of trace and major elements in sediment and pore waters of the Lean Delta and Laptev Sea*. Mar.Chem 53, 1996, 285-299.
- 10- MACKAY, D. J. ; O'SULLIVAN J.E. *Metal-organic interaction in sea water : an ecosystem experiment*. Analytica Chimica Acta, 232, 1990, 161-170.
- 11- ABOLLINO, O.; ACETO, M.; SARZNINI, C. ; MENTASTI, E. *The retention of metal species by different solid sorbents mechanisms for heavy metal speciation by sequential three column uptake*. Anal. Chim. Acta, 411, 2000, 223-237.

- 12- BRULAND, K.W.; RUE, E.L.; MOFFETT J.W. *Intercomparison of voltammetric techniques to determine the chemical speciation of dissolved copper in a coastal seawater sample*. Analytical Chimica Acta, 405, 2000, 99-113.
- 13- CARUSO, J.; SUTTON, K. ; ACKLEY, K. *Elemental speciation, new approaches for trace element analysis*. Wilson & Wilson's, Comprehensive analytical chemistry XXXIII, 2000, 480.
- 14- DOJLIDO, J. R. ; BEST, G. A. *Chemistry of water and water pollution. Ellis Horwood Series In Water And Wastewater Technology*, ,1993, 65-66.
- 15- FLORENCE, T. M. ; MORRISON, G. M. ; STAUBER, J. L. *Determination of trace element speciation and the role of speciation in aquatic toxicity*. The Science of the Total Environment 125, 1992, 1-13.
- 16- HUBER, C.; FILELLA, M. ; TOWN R. M. *Computer modelling of trace metal ion speciation: practical implementation of linear continuous function for complexation by natural organic matter*. Computers & Geosciences 28, ,2002, 587-596.
- 17- BUFFLE, J.; PERRET, D.; NEWMAN, M. *The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids, and macromolecules*. In: Buffle, J; van Leeuwen, H. P. (Eds.), Environmental Particles, Vol. 1. Lewis Publishers, Boca Raton,, 1992, 171-230.
- 18- LUND, W. *Speciation analysis- why and how ?*. Fresenius J Anal Chem 337, 1990, 557-564.
- 19- GUO, L.; SANTSCHI, P. H. ; WARNKEN, K. W. *Trace metal composition of colloidal organic material in marine environments*. Marine Chemistry, 70, 2000, 257-275.
- 20- VOELKER, B. M. ; KOGUT, M. B. *Interpretation of metal speciation data in coastal waters: the effects of humic substances on copper binding as a test case*. Marine Chemistry 74, 2001, 303-318.
- 21- GAMBLE, D. S.; SCHNITZER, M. ; HOFFMAN, I. *Cu fulvic acid chelation equilibrium in 0.1m KCl at 25 °C*. Can. J. Chem, 48(20), 1970, 3197-3204.
- 22- MANTOURA, R. F. C.; DICKSON, A. G. ; RILEY, J. P. *The complexation of metals with humic materials in natural waters*. Estuarine, Coastal and Shelf Science 6, 1978, 387-408.
- 23- KERNDORFF, H. ; SCHNITZER ,M. *Sorption of metals on humic acid*. Geochim. Cosmochim. Acta 44, 1980, 1701-1708.

