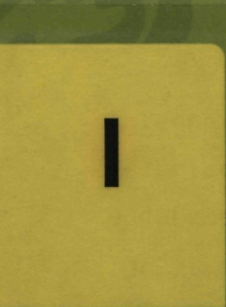


OVER DE INTERAKTIE VAN KOPER MET HUMUS;
GEEXTRAHEERD UIT MARIEN SEDIMENT

A.J. BAKS



Verslagen
lands Instituut voor
ek der Zee, Texel

12959

All rights reserved

Internal reports are not to be reprinted or cited, it is only allowed by consent of the Netherlands Institute For Sea Research.

OVER DE INTERAKTIE VAN KOPER MET HUMUS, GEËXTRAHEERD UIT MARIEN SEDIMENT*

door

A.J. BAKS

INHOUDSOPGAVE

I. Summary & Samenvatting	1
II. Inleiding	2
III. Anodic Stripping Voltammetry	3
IV. Materiaal en methoden	5
V. Resultaten	9
VI. Conclusies en discussie	15
VII. Literatuur	18

I. SUMMARY

With aid of Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) is made a study of the interaction of copper with humic substances, extracted from a core out of the west-side of the Wadden Sea. The results were a linear relationship between the copper-complexing capacity and the amount of humic substances in the solution. Some remarks are made about the deposition potentials used. The use of -900mV is recommended.

SAMENVATTING

Met behulp van Differential Pulse Anodic Stripping Voltammetry (DPASV) is de interactie onderzocht van koper met humusmateriaal, geëxtraheerd uit een kern uit de westelijke Waddenzee. Er blijkt een lineaire relatie te bestaan tussen

* Intern verslag over het werk verricht als praktijktijd voor de studie Milieuhygiëne aan de Landbouwhogeschool te Wageningen in het tijdvak 26 februari t/m 31 mei 1980 aan het NIOZ onder leiding van C.J.M. Kramer.

het koper-complexerend vermogen en de hoeveelheid humus materiaal in de oplossing. Enige opmerkingen worden gemaakt betreffende de gebruikte depositie potentialen. Het gebruik van -900mV is aan te bevelen.

II. INLEIDING

Vele metalen (o.a. Cu, Zn, Cd, Co, Cr, Ni en Mo) zijn in geringe hoeveelheden noodzakelijk voor het verloop van allerlei reacties in (aquatische) organismen, maar kunnen in hogere concentraties remmend werken of zelfs toxisch zijn. De ecologische betekenis is afhankelijk van de vorm, waarin deze metalen in het milieu voorkomen, zoals de mate van hydratatie, oxidatie en complexering en de aard van de complexering (gerefereerd door DUINKER & KRAMER, 1977). Zo zijn voor algen koper-ionen toxisch in tegenstelling tot organisch gebonden koper (GÄCHTER, LUM-SHUE-CHAN & CHAU, 1974).

Met behulp van electro-chemische technieken, bijv. Anodic Stripping Voltammetry (ASV) is het mogelijk onderscheid te maken tussen verschillende vormen, waarin metalen in oppervlaktewater kunnen voorkomen, daar alleen de electro-actieve componenten gemeten worden. Met Differential Pulse (ASV (DPASV) zijn concentratie-niveaus te meten, die voorkomen in marien milieu.

In het mariene milieu spelen organische verbindingen een belangrijke rol. Bij de afbraak van plantaardig materiaal ontstaan o.a. humusachtige verbindingen ("Humic Substances" = HS), waarvan bekend is, dat ze in staat zijn sommige metalen te binden. Ze kunnen metalen desorberen van het sediment en in oplossing brengen in de vorm van organo-metaal complexen, die gemakkelijk getransporteerd worden naar de bovenliggende

waterlagen of opgenomen worden door allerlei organismen. Het is mogelijk met DPASV te bepalen hoeveel metaal er gebonden kan worden aan deze organische liganden (=complexerend vermogen) door middel van titraties met metaal-ionen (DUINKER & KRAMER, 1977).

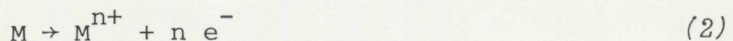
Op grond van het bovenstaande is het doel van dit onderzoek geformuleerd, nl. de interactie bepalen van een zwaar metaal (koper) en humusmateriaal, afkomstig van het sediment van verschillende diepte uit de bodem van de Waddenzee.

III. ANODIC STRIPPING VOLTAMMETRY

Gedurende een gedefiniëerde tijd (t_e) wordt er een negatieve potentiaal (E_i) gezet over het grensvlak kwik-water met behulp van een Pt-tegenelectrode. Hierbij zullen aan de kwikdruppel metaal-ionen gereduceerd worden volgens:

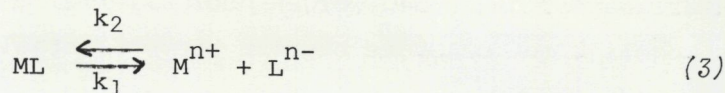


en een amalgaam vormen met kwik ("deposition"-stap). Na een korte rustperiode (t_r) laat men de potentiaal lineair met de tijd toenemen. De metalen zullen nabij hun resp. halfwaarde potentialen worden geoxideerd en weer in oplossing gaan volgens:



("stripping"-stap). Het electronentransport bij deze reactie wordt gemeten en de hoogte van het signaal (i_p) is een maat voor de concentratie van M^{n+} .

Zoals in de inleiding al gezegd is, worden op deze manier alleen de electro-aktieve componenten gemeten. In natuurlijke monsters zal een belangrijk deel van de metalen gebonden in complexen voorkomen en speelt het volgende evenwicht een rol:



(M = metaal; L = ligand; k_1 en k_2 = snelheidsconstanten; er is niet gelet op valenties). De snelheid van dissociatie verloopt volgens:

$$- \frac{d [\text{ML}]}{dt} = k_1 [\text{ML}] \quad (4)$$

Daarnaast is de snelheid van belang waarmee het vrije metaal-ion gereduceerd wordt aan de kwik-electrode (k_c = celconstante; afhankelijk van celomstandigheden, zoals druppelgrootte, roersnelheid en temperatuur) (DUINKER & KRAMER, 1977). Per definitie noemen we complexen met:

$$k_1 \geq k_c$$

labiel (=electroactief) en die met:

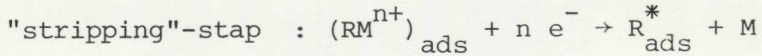
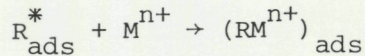
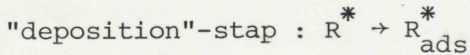
$$k_1 < k_c$$

niet labiel.

Bij de natuurlijke pH van zeewater (~ 8.1) wordt het labiele deel gevormd door vrije metaal-ionen en overwegend anorganische complexen; door aanzuren zal evenwicht (3) naar rechts verschuiven en dissociëren ook de meeste organische complexen (SHUMAN & WOODWARD, 1977).

Men moet er op bedacht zijn, dat, bij het onderzoek naar de interactie tussen metalen en organische verbindingen, de meting op verschillende wijzen beïnvloed kan worden door hoge

concentraties organische stof (GÄCHTER, LUM-SHUE-CHAN & CHAU, 1974). Oppervlakte-actieve stoffen kunnen reageren met of adsorberen aan het kwik-oppervlak, bijvoorbeeld:



(VYDRA, ŠTULÍK & JULÁKOVÁ, 1976; Tabel I en II)

waarbij het electronenproces een bijdrage levert aan het meet-sig-naal. Ook is het mogelijk, dat het electrode-oppervlak door inerte organische moleculen afgeschermd wordt, wat een ver-lagend effect op i_p heeft. Verder kunnen liganden ontleden of protonen opnemen aan het electrode-oppervlak tijdens de re-ductie van de complexen, wat bij onvoldoende buffering van het systeem een lokale pH-verandering kan veroorzaken en leiden tot irreversibele electrode-reacties (SHUMAN & WOODWARD, 1977).

Dat het ligand, dat getiteerd wordt, ook werkelijk organ-isch materiaal moet zijn, is door SHUMAN & WOODWARD (1977) beargumenteerd en kan bewezen worden door destructie met be-hulp van UV. Met UV bestraald (zee)water vertoont geen complex-erend vermogen meer.

IV. MATERIAAL EN METHODEN

Het onderzochte materiaal is afkomstig uit de geulbodem van het Fransche Gaatje bij boei FG1 (zie pijl in Fig. 1). Dit is vlakbij een zeegat; het milieu is hier zout en zanderig. De geul is hier ongeveer 4 meter diep.

De kern is op 4 maart 1980 gestoken bij laag water. Hier-voor is een PVC-buis gebruikt van 1 meter lengte, 58 mm door-

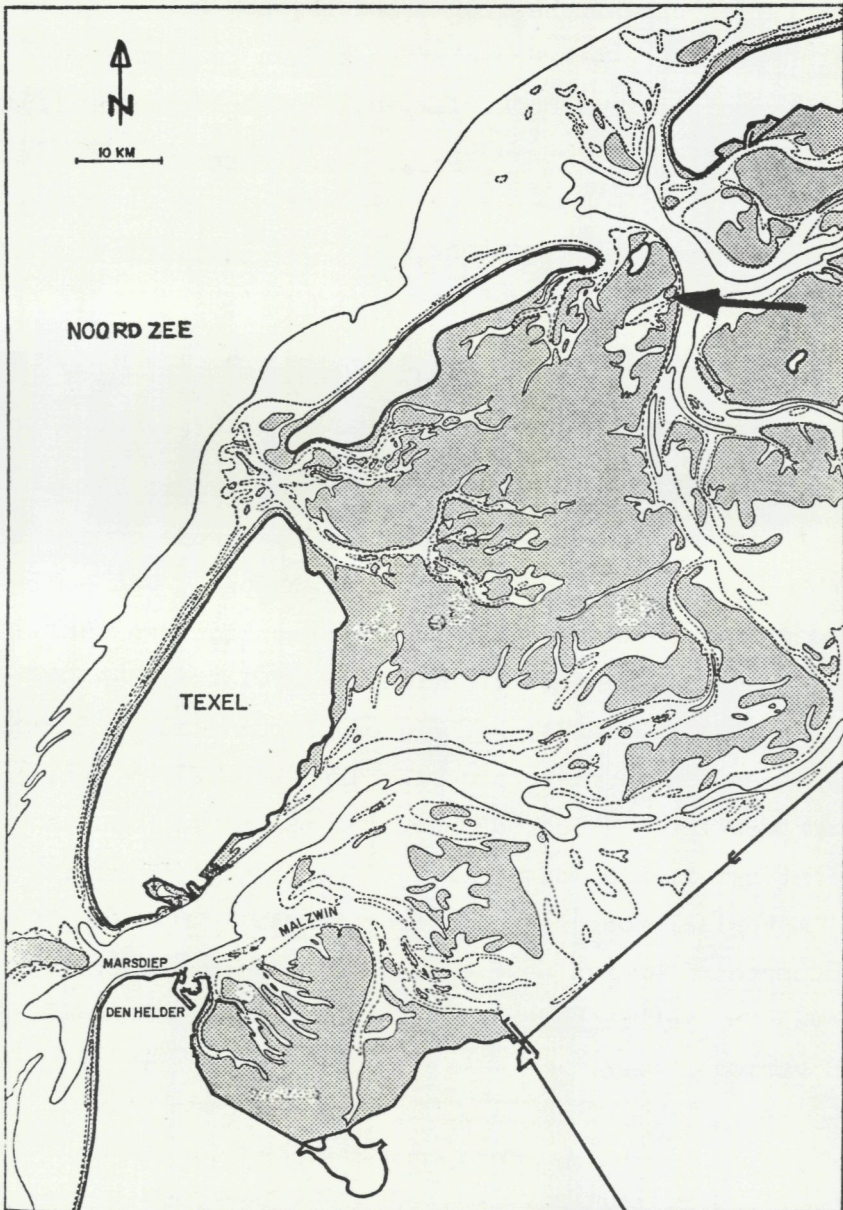


Fig. 1. Overzichtskaart van de westerlijke Waddenzee met monsterpunt.

sneede en met ter voorkoming van contaminatie een binnenhoes van poly-ethyleen. Deze pijp is met een verlengstuk erop met de hand zo ver mogelijk de bodem ingeduwd. Vervolgens is de

buis, naast de hoes, volgegoten met water en van boven afgesloten met een rubberen stop. Hierdoor wordt voorkomen, dat het bodemmateriaal uit de pijp zakt bij het omhoog trekken. Ook de onderkant is na de hoes naar binnen gevouwen te hebben afgesloten met een rubberen stop.

Aan boord is het bovenstaande water voorzichtig afgezogen. Vervolgens is (in een N_2 -tent) de 40 cm lange kern met de hoes uit de buis geduwd en verdeeld in schijven van 5 cm. Van ieder stukje is 20 cc (mengmonster), genomen mbv een afgeknipte injectie-spuut, gedurende één nacht geëxtraheerd in 50 ml 1 N NaOH. De bovenstaande vloeistof is gefiltreerd over Sartorius-membraanfilters (cellulose-acetaat, poriegrootte 0,45 μm), die voorbehandeld waren met resp. 6 N HCl en aquabidest. Het filtraat, bevattende het opgelost humusmateriaal (HS), is opgevangen in poly-ethyleen flesjes.

Om een indruk te krijgen van de hoeveelheid humusmateriaal in deze extracten is de fluorescentie gemeten en een UV-spectrum gemaakt.

De natuurlijke fluorescentie is gemeten met een Turner-fluorimeter, model III (excitatiegolflengte 365 mm, emissiegolflengte 460 mm). De aldus verkregen waarden zijn gecorrigeerd voor zelfabsorptie, gemeten met een Carl Zeiss filterphoto meter, model Elko II, bij bovengenoemde golflengten (DUURSMA & ROMMETS, 1961) en zijn weergegeven in mFl (KALLE 1963).

De UV-spectra van de extracten zijn gemaakt met een Perkin Elmer Spectrophotometer, Hitachi 2000 (slit 1,0 mm, golflengte van 600 tot ca 200 nm, 1 cm kwartscuvetten).

Voor het bepalen van het koper-complexerend vermogen van de extracten is gebruik gemaakt van PAR model 174 Polarographic Analyzer met PAR Automated Electro-Analysis Control-

ler model 315. De kwik electrode was een "Hanging Mercury Drop Electrode" (HMDE) van Metrohm; de referentie electrode een Ag/AgCl (sat. KCl) en de tegenelectrode een Pt draad. De metingen vonden plaats in een gethermostreerde ($25.0^{\circ}\text{C} \pm 0,1$), met Desicote van Beckmann behandelde, cel. De gebruikte methode is ontwikkeld door DUINKER & KRAMER (1977).

De referentie-electrode is met de andere electroden bewaard in de cel met aquabidest. In plaats van een glaspipet, behandeld met Desicote is een kwartspipet van 25 ml gebruikt om de cel te vullen. Voor de depositie-potentiaal is -350 ml gebruikt; later -900 mV. De depositie-tijd (t_e) bedroeg 100 seconden. Een basis lijn is verkregen door het trekken van een rechte lijn tussen de laagste punten van het voltammogram.

Het complexerend vermogen van een oplossing is te bepalen door te titreren met metaal-ionen. De gemeten titratie-curve, met op de x-as de toegevoegde hoeveelheid koper en op de y-as de piekhoogte, bestaat uit twee delen één, waar het ligand getitreerd wordt en de ASV-respons laag is, omdat het meeste vrije metaal direkt met L reageert en een stuk na het omslagpunt waar de respons stijgt met de toenemende hoeveelheid niet-gecomplexeed metaal.

Alle chemicaliën, die bij dit experiment zijn gebruikt waren van Supra Pur kwaliteit (Merck). Ook is zo schoon mogelijk zeewater gebruikt, dat afkomstig was van de noordelijke Noordzee. Al het glaswerk is behandeld met Desicote van Beckmann en is evenals al het plastic voor gebruik gespoeld met 6 N HCl en aquabidest.

Aan 25 ml zeewater is een hoeveelheid extract variërend van 50 tot 1000 μl toegevoegd met Eppendorfpipetten. Dit zeewater was van te voren gedurende 10 uur bestraald in kwartsbuizen met koelers door een UV-lamp van 1000W (Hanovia, Hg,

medium pressure) om het aanwezige organische materiaal te destrueren. Voor de verdunning is zeewater gebruikt in plaats van bijv. aquabidest om het complexerend vermogen van het humusmateriaal te meten in een milieu, dat zoveel mogelijk overeenkomt met het natuurlijke wat betreft pH, ionensterkte en -samenstelling (zie ook CHAU, GÄCHTER & LUM-SHUE-CHAN, 1974).

Na het bepalen van het koper-complexerend vermogen is een deel van ieder extract gescheiden in fulvine-("fulvic"- = FA) en humuszuren ("humic acids" = HA) door aanzuren tot pH=2 met HCl, waardoor de FA in oplossing blijven en de HA neerslaan. Extract aangezuurd met 12N HCl tot pH2 is gedurende 30 minuten gecentrifugeerd bij 12000g (MSE High Speed 18). Hierna is de bovenstaande heldere oplossing overgepipetteerd in polyethyleen flesjes en is het neerslag, na te zijn gewassen met 10^{-2} N HCl opgelost in aquabidest en op pH=8 gebracht met 1N NaOH. Vervolgens is het complexerend vermogen van alle FA - en van twee HA-fracties (5-10 cm; 35-40 cm) bepaald.

Tot slot zijn enkele metingen opnieuw gedaan met een E_i van -900 mV en is het totaal koper-gehalte van de extracten bepaald met de Atomaire Absorptie Spectrophotometer (AAS ; Perkin Elmer 5000).

V. RESULTATEN

In Fig. 2 zijn de resultaten van de fluorescentie-metingen van de HS-extracten weergegeven.

Uit de figuur is af te lezen, dat de fluorescentie van de bovenste 10 cm ongeveer 4× hoger is dan van de daaronder liggende laag van 10 cm en ongeveer 8× hoger dan de nog dieper liggende lagen, die op zich weinig variatie vertonen.

De UV-spectra van de HS-extracten zijn weergegeven in Fig. 3. Uit deze figuur is hetzelfde als uit Fig. 2 af te leiden.

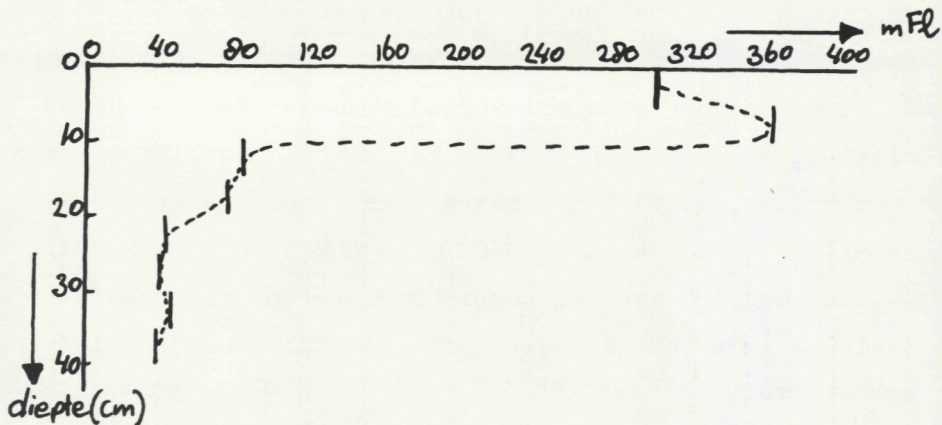


Fig. 2. Fluorescentieprofiel van de HS-extracten uit de geulbodem van het Fransche Gaatje (maart 1980).

In alle extracten is organisch materiaal aanwezig; het meeste in de bovenste 10 cm, minder in de 10 cm daaronder en nog minder dieper de grond in.

Zoals eerder vermeld, is het koper-complexerend vermogen van een oplossing te bepalen door een aantal standaard-toevoegingen met koper-ionen. In Fig. 4 zijn de opeenvolgende voltammogrammen van één zo'n titratie weergegeven. Naar boven neemt het gehalte van het toegevoegde koper toe. Dit zijn de meetuitkomsten van 200 μ l HS-extract van 0-5 cm diepte, waarvan om de 4 minuten 4 ppb koper is toegevoegd. De depositie-potentiaal bedroeg -350 mV. Door de hoogte van de piek bij -177 mV uit te zetten tegen de toegevoegde hoeveelheid koper-ionen is het koper-complexerend vermogen af te lezen (zie Fig. 5; omslagpunt), evenals de helling van de lijn na het bereiken van het omslagpunt. Het complexerend vermogen is gelijk aan 15 ppb voor 200 μ l HS-extract en de helling is 19 nA.ppb⁻¹.

Op deze wijze is het koper-complexerend vermogen en de helling van een aantal verdunningen van alle HS-extracten bepaald en van één verdunning van alle FA- en twee HA-fracties

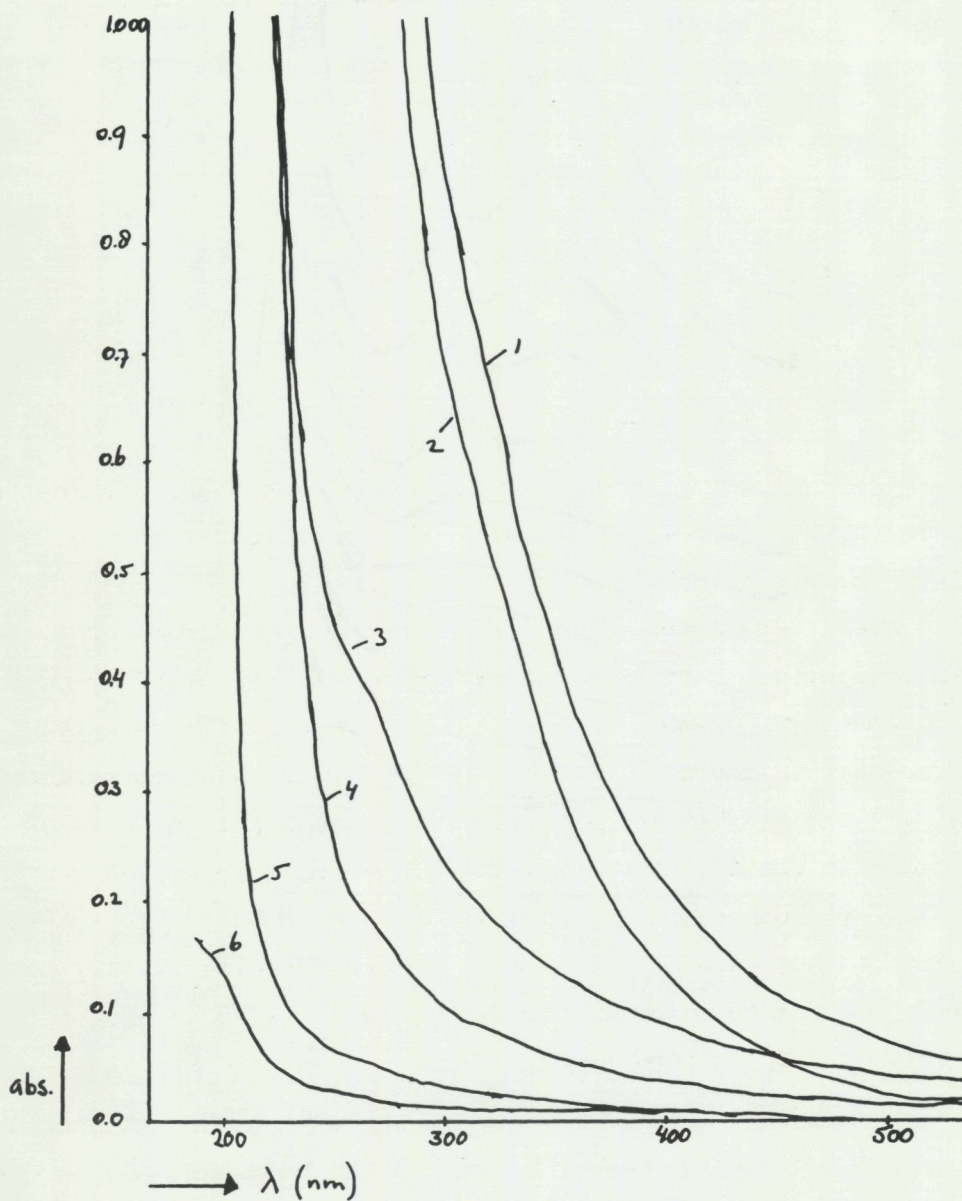


Fig. 3. UV-spectra van de HS-extracten uit de geulbodem van het Fransche Gaatje. (1) extract van 0-5 cm; (2) 5-10; (3) 10-15 en 15-20; (4) 20-25, 25-30, 30-35 en 35-40; (5) blanco; en (6) aquadest.

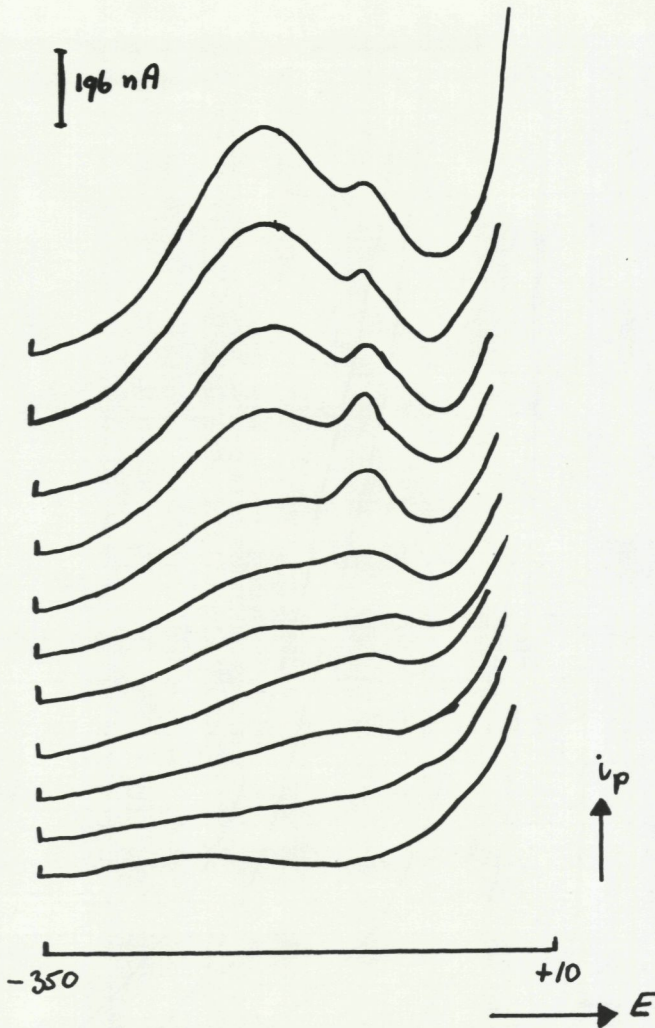


Fig. 4. Voltammogrammen van een titratie van HS-extract met koper-ionen. Blanco met naar boven toe steeds 4 ppb Cu toegevoegd.

(Tabel I). In geval van twijfel is een duplo-meting uitgevoerd. Er zijn slechts twee HA-fracties onderzocht, omdat er aanwijzingen bestonden, dat deze fractie op eerder beschreven wijze gescheiden van de FA-fractie, geen complexerend vermogen heeft (Berns, pers. med).

In Tabel II zijn de resultaten vermeld van de metingen uitgevoerd met een E_i van -900 mV.

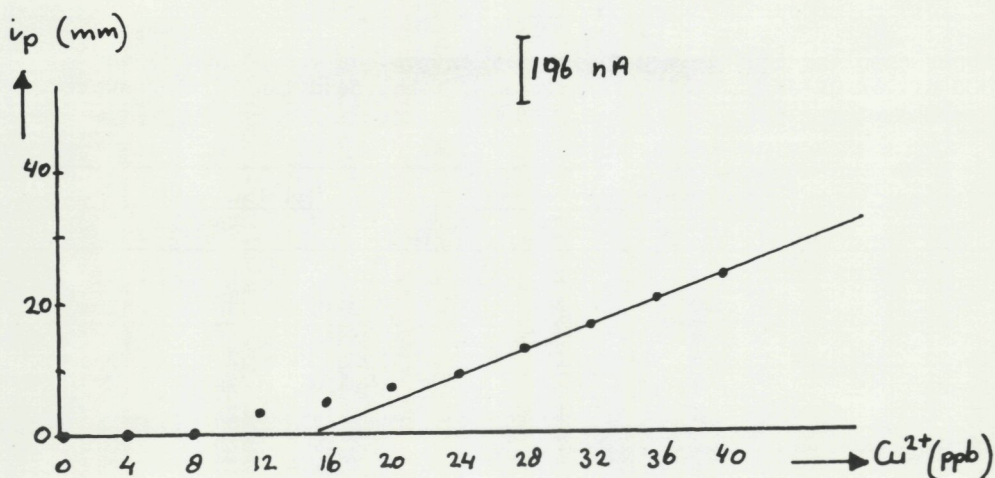


Fig. 5. Piekhoogte (i_p) afhankelijk van de toegevoegde hoeveelheid Cu^{2+} van een monster met P_{200} μl HS-extract.

Tabel I

Koper-complexerend vermogen (in ppb) en respons (in $\text{nA}\cdot\text{ppb}^{-1}$) van HS-extracten, FA- en HA- fracties (in μl), toegevoegd aan 25 ml zeewater.
 $E_i = -350$ mV.

Diepte (cm)	Complexerend vermogen								Helling							
	HS				FA	HA	HS				FA	HA				
	50	100	150	200	500	1000	500	500	50	100	150	200	500	1000	500	500
0-5	0	0	13	15	33	64	18		16	19	22	19	8	8	15	
			7		26						22		9			
5-10	0	8	16	16	45	122	26	0	28	21	23	12	7	6	15	19
			10								24					
10-15			0	1	7	18	7				29	26	23	11	19	
15-20				0	1	15	4					15	12	17	25	
					7							22				
20-25				0	6	19	4					23	20	21	28	
25-30				0	6	12	3					30	23	23	25	
30-35				0	4	15	3					29	22	26	30	
					5							20				
35-40		0		0	8	28	3	0	15			19	25	18	24	25
						21								14		
Blanco					0	0							38	33		
Zeew.					0								37			
Zeew. pH=2					0								34			

Tabel II

Koper-complexerend vermogen (in ppb) en respons (in nA.ppb⁻¹) van 500 µl van HS-extracten en FA-fracties, toegevoegd aan 25 ml zeewater.
E₁ = -900 mV.

Diepte (cm)	Complexerend vermogen		Helling	
	HS	FA	HS	HA
0-5	9	2	18	16
5-10	10	8	16	20
10-15	4	4	13	28
15-20	5	2	14	29
20-25	4	1	18	28
25-30	4	1	17	25
30-35	3	1	28	26
35-40	1	2	26	27
Zeew.	0		42	
Zeew. pH=2	0		42	

In de Tabellen (I en II) staan ook waarden vermeld gevonden voor de blanco, bestaande uit 1N NaOH aangezuurd tot pH=8 met 12N HCl, voor zeewater en voor zeewater met pH=2. In al deze gevallen is het koper-complexerend vermogen gelijk aan nul en de helling ca 36 nA.ppb⁻¹. Dit komt overeen een met hetgeen er in hoofdstuk II en III beschreven is, namelijk dat er na UV-bestraling geen organisch materiaal meer aanwezig is, waardoor geen storende electrode-reacties optreden.

Uit de Tabel I, is af te lezen dat het complexerend vermogen een lineair verband vertoont met de hoeveelheid organisch materiaal, zowel in de diepte als bij de verdunningen. Dit gaat niet meer op bij hoge concentraties HS. Onder deze omstandigheden is het complexerend vermogen van de HA-fracties gelijk aan nul; dat van de FA-fracties lijkt iets lager te liggen dan van de HS-extracten. In alle gevallen is de helling kleiner dan van de blanco (34-37 nA.ppb⁻¹). Bij lage concentraties organisch materiaal benadert de helling die van de

blanco, maar naarmate er meer organisch materiaal aanwezig is wordt de afwijking groter.

Ook is uit deze tabel af te lezen dat de spreiding in het complexerend vermogen soms groot kan zijn.

Uit Tabel II blijkt dat de helling van de FA- en HS-fracties beneden 10 cm gelijk zijn aan elkaar. Het complexerend vermogen van de FA-fracties is iets lager dan dat van de HS-extracten. De gegevens uit deze tabel komen overeen met die uit Tabel I, wanneer wordt gekeken naar de FA- en HS-fracties beneden 10 cm. Bij een pre-electrolyse potentiaal van -900 mV neemt boven 10 cm (hoge concentratie organisch materiaal) de helling van HS toe en blijft die van FA gelijk. Het complexerend vermogen daalt echter bij beide drastisch.

In Tabel III zijn de gegevens vermeld van de AAS-metingen van het totale koper-gehalte van de HS-extracten.

Tabel III

AAS-gegevens van het kopergehalte van de HS-extracten.

Diepte (cm)	Cu-gehalte (ppb)
0-5	43
5-10	40
10-15	36
15-20	46
20-25	12
25-30	10
30-35	10
35-40	11

VI. CONCLUSIES EN DISCUSSIE

Een aantal conclusies, die direkt uit de tabellen zijn af te lezen, zijn in het vorige hoofdstuk al genoemd en worden hieronder niet herhaald.

Tijdens een symposium in Rovinj (KRAMER pers. med.) in mei 1980 kwam naar voren, dat -350 mV voor E_i aan de hoge kant zou zijn. Organische stoffen blijken bij deze potentiaal nog makkelijk aan de kwik-electrode te reageren met alle storende invloeden van dien (zie hoofdstuk II). Reden om een lagere depositie-potentiaal (-900 mV) te gebruiken (Tabel II). Uit de Tabellen I en II blijkt dat de problemen betreffende de helling hierdoor grotendeels zijn opgelost. Bij lager concentraties HS en FA zijn de helling en het complexerend vermogen bij beide depositie-potentialen redelijk met elkaar in overeenstemming, waardoor aangenomen mag worden, dat de afscherming van de elektrode door het organische materiaal in dit geval gering was. Treedt er een afscherming op van het elektrode-oppervlak, dan mogen de hellingen niet meer met die van de blanco's vergeleken worden.

Bij hogere gehalten organisch materiaal heeft het verschil in E_i zeker invloed. De helling neemt toe, het complexerend vermogen af. Vergelijken met de monsters, waarin minder organisch materiaal is opgelost is de toename van de helling ook nog niet voldoende. Een verklaring voor dit feit zou kunnen zijn, dat de complexerings-reacties in het laatste geval langzamer verlopen en dat de laatste punten van de titratiecurven nog niet exact op een rechte lijn lagen. Dit betekent dat de schuine lijn een kleinere helling heeft dan behoort en de x-as dicht bij de oorsprong snijdt. Zonder elektrodebijreacties zou de helling overeen moeten komen met die van gedestruerd zeewater, maar in geen enkele geval is deze zelfs benaderd.

De oorsprong van het extra piekje in de voltammogrammen van Fig. 4 is onzeker. Het treedt wel vaker op bij dit soort

titraties en wordt groter met toenemend humus-gehalte, maar niet met toenemend koper-gehalte. Bevindt zich alleen koper in de oplossing, dan is het geheel afwezig. Waarschijnlijk is deze piek het gevolg van adsorptie van koper-humus complexen aan de electrode (KRAMER & DUINKER, 1980).

Uit Fig. 5 blijkt, dat de titratie-curve niet op te bouwen is door twee rechte lijnen, maar dat in de buurt van het complexerend vermogen de titratie-punten een positieve afwijking hebben. Dit verschijnsel trad in alle titratie-curven op en wordt door DUINKER & KRAMER (1977) verklaard.

Het totale koper-gehalte van de extracten is bepaald om een indruk te krijgen door hoeveel koper het organische materiaal al bezet was. Opvallend is, dat de factor tussen de laagjes onderling, die gevonden wordt bij de fluorescentie-meting niet teruggevonden wordt bij de uitkomsten van het totale-koper gehalte. Dit betekent, Tabel III en Fig. 2 met elkaar vergelijkend, dat het humusmateriaal uit de laag van 10-20 cm diepte naar verhouding meer koper bevat dan het materiaal uit de bovenste 10 cm en ook meer dan de lagen daaronder.

Zo bevat het humus uit de bovenste 10 cm van de geulbodem relatief het minste koper. Dit is waarschijnlijk veroorzaakt door uitspoeling met de bovenstaande waterlaag.

Verder is te zien, dat het complexerend vermogen van de monsters van 15-20 cm diepte en van 20-25 cm diepte gelijk aan elkaar zijn (Tabel I); het totale-koper gehalte ongeveer een factor 4 verschilt (Tab. III) en het humus-gehalte een factor 2 (Fig. 2). Dit is niet met elkaar in tegenspraak, zelfs niet als de humussamenstelling met de diepte niet verandert. De korrelgrootteverdeling zou een belangrijke factor kunnen zijn.

Tenslotte wil ik iedereen, die geholpen heeft bij het uitvoeren van de experimenten bedanken voor deze hulp.

VII. LITERATUUR

- ALLEN, H.E., W.R. MATSON & K.H. MANCY, 1970. Trace metal characterization in aquatic environments by anodic stripping voltammetry.-*J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 42: 573-581.
- CHAU, Y.K., R. GÄCHTER & K. LUM-SHUE-CHAN, 1974. Determination of the apparent complexing capacity of lake waters.-*J. Fish. Res. Bd. Can.* 31: 1515-1519.
- CHAU, Y.K., & K. LUM-SHUE-CHAN, 1974. Determination of labile and strongly bound metals in lake water.-*Water Res.* 8: 383-388.
- DUINKER, J.C. & C.J.M. KRAMER, 1977. An experimental study on the speciation of dissolved zinc, cadmium, lead and copper in river Rhine and North Sea water, by differential pulsed anodic stripping voltammetry.-*Mar. Chem.* 5: 207-228.
- DUURSMA, E.K. & J.W. ROMMETS, 1961. Interprétation mathématique de la fluorescence des eaux douces, saumâtres et marines.-*Neth. J. Sea Res.* 1: 391-405.
- GÄCHTER, R., K. LUM-SHUE-CHAN & Y.K. CHAU, 1974. Complexing capacity of the nutriënt medium and its relation to inhibition of algal photosynthesis by copper.-*Schweiz. Z. Hydrol.* 35: 252-261.
- KALLE, K., 1963. Über das Verhalten und der Herkunft der himmelblauen Fluorescenz.-*Dt. hydrogr. Z.*, 16: 153-166.
- KRAMER, C.J.M. & J.C. DUINKER, 1980. Complexing of copper by sediment extracted humic and fulvic material.-*Thalassia jugosl.*, (1980) 16: (2/3) (in press).
- SHUMAN, M.S. & G.P. WOODWARD, 1977. Stability constants of copper-organic chelates in aquatic samples.-*Env. Sci. Techn.*, 11: 809-813.
- VYDRA, F., K. STULÍK, & E. JULÁKOVÁ, 1976. Electrochemical stripping analysis.-Chichester Halsted Press, New York.