

Elektrokemijsko određivanje kapaciteta kompleksiranja bakra u površinskom sloju mora obalnog srednjeg Jadrana

Dešpoja, Iva

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Split, Faculty of Chemistry and Technology / Sveučilište u Splitu, Kemijsko-tehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:167:374684>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-05**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of chemistry and technology - University of Split](#)



UNIVERSITY OF SPLIT



DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET

ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE KAPACITETA
KOMPLEKSIRANJA BAKRA U POVRŠINSKOM SLOJU MORA
OBALNOG SREDNJEG JADRANA

DIPLOMSKI RAD

IVA DEŠPOJA

Matični broj: 107

Split, travanj 2021.

SVEUČILIŠTE U SPLITU
KEMIJSKO-TEHNOLOŠKI FAKULTET
DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE
ORGANSKA KEMIJA I BIOKEMIJA

ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE KAPACITETA
KOMPLEKSIRANJA BAKRA U POVRŠINSKOM SLOJU MORA
OBALNOG SREDNJEG JADRANA

DIPLOMSKI RAD

IVA DEŠPOJA

Matični broj: 107

Split, travanj 2021.

UNIVERSITY OF SPLIT
FACULTY OF CHEMISTRY AND TECHNOLOGY
MASTER STUDY OF CHEMISTRY
ORGANIC CHEMISTRY AND BIOCHEMISTRY

**ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF COPPER
COMPLEXING CAPACITY IN THE SURFACE LAYER OF THE
COASTAL MIDDLE ADRIATIC SEA**

DIPLOMA THESIS

IVA DEŠPOJA

Parent number: 107

Split, April, 2021.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište u Splitu

Kemijsko-tehnološki fakultet u Splitu

Diplomski studij kemije: Organska kemija i biokemija

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

Tema rada je prihvaćena na 6. sjednici Fakultetskog vijeća Kemijsko tehnološkog fakulteta održanoj 15. i 16. prosinca 2020. godine.

Mentor: prof. dr. sc. Zoran Grubač, Kemijsko-tehnološki fakultet, Split

Neposredni voditelj: dr. sc. Slađana Strmečki Kos, znanstvena suradnica, Institut Ruđer Bošković, Zagreb

ELEKTROKEMIJSKO ODREĐIVANJE KAPACITETA KOMPLEKSIRANJA BAKRA U POVRŠINSKOM SLOJU MORA OBALNOG SREDNJEG JADRANA

Iva Dešpoja, 107

Sažetak: U radu je proučavan utjecaj specifičnog atmosferskog taloženja organske tvari na kapacitet kompleksiranja Cu^{2+} (CuCC) u površinskim slojevima mora, s naglaskom na površinski mikrosloj mora (SML) srednjeg Jadrana koji je posebno osjetljiv na vanjske utjecaje u oligotrofnim uvjetima (veljača – srpanj 2019. godine). Primjenjena je diferencijalno pulsna voltametrijom anodnog otapanja metala (DPASV) sa živinom kao radnom elektrodom. Dobiveni eksperimentalni podaci transformirani su u Langmuir/Gerringa nelinearni matematički model u programu ProMCC u kojem su određeni parametri CuCC (klase organskih liganada, njihove koncentracije i prividne konstante stabilnosti). Odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti: $E_a = -0,6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1,4$ V tijekom 1 s, [Triton-X-100] = 1 mg/L. Prisustvo L_2 klase liganada ($[L_2] = 28 - 392$ nM) utvrđeno je u svim uzorcima SML, dok je samo u četiri uzorka pronađena L_1 klasa liganada s koncentracijama $[L_1] = 41 - 76$ nM. Koncentracije L_2 klase liganada u potpovršinskoj vodi (ULW) bile su u rasponu od 20 – 70 nM. Vrijednosti uvjetnih konstanti stabilnosti za uzorke SML bile su u rasponu $\log K_{\text{CuL1}} = 10,34 - 11,11$ i $\log K_{\text{CuL2}} = 9,51 - 10,18$. Dobiveni rezultati su usporedivi s onima poznatima za istočno Sredozemno more. Faktor obogaćenja SML u odnosu na ULW za ukupnu koncentraciju organskih liganada bio je u rasponu od 0,9 – 9,1, s najvišim koncentracijama u SML koje ne potječu iz vodenog stupca, već su posljedica specifičnog atmosferskog donosa peludi u travnju 2019. godine. Donosi aerosola otvorenog požara i Saharske prašine u istraživanom razdoblju nisu imali značajan utjecaj na parametre CuCC. Koncentracija slobodnog bakra (2 – 46 pM) bila je u rasponu procijenjenih toksičnih granica koncentracije bakra od oko 10 pM.

Ključne riječi: atmosfersko taloženje, površinski mikrosloj mora, DPASV, kapacitet kompleksiranja

Rad sadrži: 80 stranica, 36 slika, 7 tablica, 47 literaturnih referenci

Jezik izvornika: hrvatski

Sastav Povjerenstva za obranu:

- | | |
|---------------------------------------|-------------|
| 1. doc. dr. sc. Maša Buljac | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Ivana Škugor Rončević | član |
| 3. prof. dr. sc. Zoran Grubač | mentor |

Datum obrane: 30. travnja 2021. godine

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Kemijsko-tehnološkog fakulteta Split, Ruđera Boškovića 35.

BASIC DOCUMENTATION CARD

DIPLOMA THESIS

University of Split

Faculty of Chemistry and Technology Split

Master study of Chemistry: Organic Chemistry and Biochemistry

Scientific area: Natural science

Scientific field: Chemistry

Thesis subject was approved by Faculty Council of Faculty of Chemistry and Technology, session no. 6 held on 15 th and 16 th December 2020.

Mentor: Zoran Grubač, PhD, associate prof., Faculty of Chemistry and Technology, Split

Immediate supervisor: Slađana Strmečki Kos, PhD, Research associate, Ruđer Bošković Institute, Zagreb

ELECTROCHEMICAL DETERMINATION OF COPPER COMPLEXING CAPACITY IN THE SURFACE LAYER OF THE COASTAL MIDDLE ADRIATIC SEA

Iva Dešpoja, 107

Abstract: We studied the effect of atmospheric organic matter deposition on the Cu^{2+} complexing capacity (CuCC) in the surface seawater layer of the middle coastal Adriatic, especially in the sea-surface microlayer (SML) during the period of retrieval of the oligotrophic conditions (February-July 2019). We applied differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) in conjunction with static mercury drop working electrode. The obtained experimental data were fitted into the Langmuir/Gerringa nonlinear mathematical model built in the ProMCC software to determine CuCC parameters (organic ligand class, its concentration and apparent stability constant). We defined the optimal experimental conditions: $E_a = -0.6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1.4$ V for 1 s, [Triton-X-100] = 1 mg/L. The presence of L_2 ligand class ($[L_2] = 28 - 392$ nM) was determined in all SML samples, while only in four samples L_1 ligand class with concentrations $[L_1] = 41 - 76$ nM were found. The determined concentrations of L_2 ligand class in the underlying water (ULW) ranged from 20 – 70 nM. Values of conditional stability constants for the SML samples were in the range $\log K_{\text{CuL1}} = 10.34 - 11.11$ and $\log K_{\text{CuL2}} = 8.32 - 10.02$, and for the ULW samples $\log K_{\text{CuL2}} = 9.51 - 10.18$. These values are comparable to the values known for the eastern Mediterranean. The SML showed enrichment with organic ligands by a factor of 0.9 – 9.1 relative to ULW, with the highest concentrations of organic ligands present in SML originating from the specific atmospheric deposition of pollen in April 2019. The deposition of open fires and Saharan dust aerosols in the study period did not have a significant effect on CuCC parameters. The free Cu concentrations (2 – 46 pM) were in the range of the estimated toxic Cu concentration limits of about 10 pM.

Keywords: atmospheric deposition, sea surface layer, DPASV, complexation capacity

Thesis contains: 80 pages, 36 figures, 7 tables, 47 references

Original in: Croatian

Defence committee:

- | | | |
|----|---|--------------|
| 1. | Maša Buljac, PhD, Associate professor | chair person |
| 2. | Ivana Škugor Rončević, PhD, Associate professor | member |
| 3. | Zoran Grubač, PhD, Professor | supervisor |

Defence date: April, 30th 2021

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of Faculty of Chemistry and Technology Split, Ruđera Boškovića 35.

Diplomski rad izrađen je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu u Laboratoriju za biogeokemiju mora i atmosfere Zavoda za istraživanje mora i okoliša pod neposrednim voditeljstvom dr. sc. Slađane Strmečki Kos, znanstvene suradnice Instituta Ruđer Bošković i pod mentorstvom prof. dr. sc. Zorana Grubača, u razdoblju od listopada 2020. godine do travnja 2021. godine.

Diplomski rad izrađen je u okviru projekta Hrvatske zaklade za znanost IP-2018-01-3105 pod nazivom „Biokemijski odgovori površinskog sloja oligotrofnog područja Jadranskog mora na atmosfersko taloženje (BiREADI)“ voditeljice dr. sc. Sanje Frke Milosavljević.

Veliko hvala neposrednoj voditeljici dr. sc. Slađani Strmečki Kos koja mi je pružila priliku i omogućila izradu ovog rada pod svojim vodstvom. Hvala Vam na predloženoj temi, posvećenom vremenu, znanju koje ste mi prenijeli, stručnoj pomoći i svim savjetima tijekom cjelokupne izrade diplomskog rada. Vaš će mi primjer uvelike poslužiti kao primjer izvrsnosti i težnje prema napretku.

Veliko hvala i mentoru, dr. sc. Zoranu Grubaču, na ukazanom povjerenju, korisnim diskusijama te svim stručnim ali i prijateljskim savjetima tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se dr. sc. Abri Penezić za mjerenja ukupne koncentracije bakra, Zdeslavu Zovku, dr. sc. Jeleni Dautović i dr. sc. Ani Cvitešić Kušan za mjerenja otopljenog i partikularnog organskog ugljika, dr. sc. Dariju Omanoviću za pomoć pri upotrebi ProMCC programa, kao i svim ostalim članovima Laboratorija za biogeokemiju mora i atmosfere Instituta Ruđer Bošković koji su na bilo koji način doprinijeli izradi ovog rada.

Na kraju, najveću zahvalu upućujem svojim roditeljima koji su bili moja najveća podrška tijekom studiranja.

ZADATAK DIPLOMSKOG RADA

1. Određivanje parametara kapaciteta kompleksiranja bakra za površinski mikrosloj mora i potpovršinsku vodu oligotrofnog srednjeg Jadrana za razdoblje veljača – srpanj 2019. godine, što označava određivanje broja razreda liganada, njihove koncentracije i prividne konstante stabilnosti nastalih kompleksa.
2. Praćenje utjecaja specifičnog atmosferskog donosa na navedene parametre CuCC, praćenje faktora obogaćenja te količine organskih liganada po masi ukupnog otopljenog ugljika.
3. Dobivanje uvida u količinu bakra koja može biti donešena u more srednjeg obalnog Jadrana prije nego se pojavi slobodan, a ujedno i toksičan oblik metala.

SAŽETAK

U radu je proučavan utjecaj specifičnog atmosferskog taloženja organske tvari na kapacitet kompleksiranja Cu^{2+} (CuCC) u površinskim slojevima mora, s naglaskom na površinski mikrosloj mora (SML) srednjeg Jadrana koji je posebno osjetljiv na vanjske utjecaje u oligotrofnim uvjetima (veljača – srpanj 2019. godine). Primjenjena je diferencijalno pulsna voltimetrija anodnog otapanja metala (DPASV) sa živinom kap elektrodom kao radnom elektrodom. Dobiveni eksperimentalni podaci transformirani su u Langmuir/Gerringa nelinearni matematički model u programu ProMCC u kojem su određeni parametri CuCC (klase organskih liganada, njihove koncentracije i prividne konstante stabilnosti). Odabrani su optimalni eksperimentalni uvjeti: $E_a = -0,6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1,4$ V tijekom 1 s, [Triton-X-100] = 1 mg/L. Prisustvo L_2 klase liganada ($[L_2] = 28 - 392$ nM) utvrđeno je u svim uzorcima SML, dok je samo u četiri uzorka pronađena L_1 klasa liganada s koncentracijama $[L_1] = 41 - 76$ nM. Koncentracije L_2 klase liganada u potpovršinskoj vodi (ULW) bile su u rasponu od 20 – 70 nM. Vrijednosti uvjetnih konstanti stabilnosti za uzorke SML bile su u rasponu $\log K_{\text{CuL1}} = 10,34 - 11,11$ i $\log K_{\text{CuL2}} = 9,51 - 10,18$. Dobiveni rezultati su usporedivi s onima poznatima za istočno Sredozemno more. Faktor obogaćenja SML u odnosu na ULW za ukupnu koncentraciju organskih liganada bio je u rasponu od 0,9 – 9,1, s najvišim koncentracijama u SML koje ne potječu iz vodenog stupca, već su posljedica specifičnog atmosferskog donosa peludi u travnju 2019. Donosi aerosola otvorenog požara i Saharske prašine u istraživanom razdoblju nisu imali značajan utjecaj na parametre CuCC. Koncentracija slobodnog bakra (2 – 46 pM) bila je u rasponu procijenjenih toksičnih granica koncentracije bakra od oko 10 pM.

Ključne riječi: atmosfersko taloženje, površinski mikrosloj mora, DPASV, kapacitet kompleksiranja

SUMMARY

We studied the effect of atmospheric organic matter deposition on the Cu^{2+} complexing capacity (CuCC) in the surface seawater layer of the middle coastal Adriatic, especially in the sea-surface microlayer (SML) during the period of retrieval of the oligotrophic conditions (February-July 2019). We applied differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) in conjunction with static mercury drop working electrode. The obtained experimental data were fitted into the Langmuir/Gerringa nonlinear mathematical model built in the ProMCC software to determine CuCC parameters (organic ligand class, its concentration and apparent stability constant). We defined the optimal experimental conditions: $E_a = -0.6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1.4$ V for 1 s, [Triton-X-100] = 1 mg/L. The presence of L_2 ligand class ($[L_2] = 28 - 392$ nM) was determined in all SML samples, while only in four samples L_1 ligand class with concentrations $[L_1] = 41 - 76$ nM were found. The determined concentrations of L_2 ligand class in the underlying water (ULW) ranged from 20 – 70 nM. Values of conditional stability constants for the SML samples were in the range $\log K_{\text{CuL1}} = 10.34 - 11.11$ and $\log K_{\text{CuL2}} = 8.32 - 10.02$, and for the ULW samples $\log K_{\text{CuL2}} = 9.51 - 10.18$. These values are comparable to the values known for the eastern Mediterranean. The SML showed enrichment by organic ligands with a factor of 0.9 – 9.1 relative to ULW, with the highest concentrations of organic ligands present in SML originating from the specific atmospheric deposition of pollen in April 2019. The deposition of open fire and Saharan dust aerosols in the study period did not have a significant effect on CuCC parameters. The free Cu concentrations (2 – 46 pM) were in the range of the estimated toxic Cu concentration limits of about 10 pM.

Keywords: atmospheric deposition, sea surface layer, DPASV, complexation capacity

Sadržaj

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	4
2.1. Atmosfersko taloženje u more.....	5
2.2. Površinski mikrosloj mora.....	6
2.3. Bakar u morskoj vodi	8
2.4. Kapacitet kompleksiranja metala (MCC).....	10
2.5. Pseudopolarografija.....	14
2.6. Voltometrija.....	15
2.6.1. Diferencijalno pulsna voltometrija anodnog otapanja metala (DPASV).....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka	20
3.2. Instrumentacija i pribor	21
3.3. Uvjeti i način mjerenja	23
3.4. Obrada podataka.....	24
3.5. Korištene kemikalije i priprema otopina	25
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. Definiranje eksperimentalnih uvjeta mjerenja.....	28
4.1.1. Priprema filtera.....	28
4.1.2. Pseudopolarografija.....	29
4.1.3. Eliminacija interferencija	31
4.1.4. Vrijeme akumulacije	40
4.2. Promjena parametara CuCC tijekom razdoblja veljača – srpanj 2019.....	44
4.3. Količina liganada po masi otopljenog organskog ugljika	56
4.4. Modeli specifičnog atmosferskog taloženja	60
4.3.1. Aerosol požara.....	60
4.3.2. BSA kao model za proteine u peludu	61
4.5. Faktori obogaćenja za organske ligande i DOC	63
4.6. Povezanost koncentracije organskih liganada i ukupne koncentracije bakra	66
4.7. Procjena koncentracije slobodnog bakra	68
4.8. Usporedba parametara CuCC u površinskom sloju mora različitih dijelova Europe.....	70
5. ZAKLJUČCI	72
6. LITERATURA	75

1. UVOD

Površinski mikrosloj mora (engl. *sea-surface microlayer*, SML) kao gornji milimetar morske površine čini najveću prirodnu granicu faza atmosfera - more. Atmosfersko taloženje ima direktan utjecaj na biogeokemijske procese u SML i od posebnog je značaja u oligotrofnim obalnim područjima koja čine oko 60 % globalnog oceana. Atmosferskim unosom aerosola morska se voda opskrbljuje hranjivim solima (nitrati, nitriti, amonijevi ioni, fosfati), metalima u tragovima (npr. Cu, Fe, Mn, Zn, Pb, Cd) i organskom tvari, što izravno utječe na sastav morskog fitoplanktona i primarnu produkciju. Metali u tragovima su u moru raspodijeljeni među anorganskim i organskim kemijskim vrstama te na taj način reguliraju svoj biogeokemijski ciklus i biodostupnost. Neki od metala u tragovima korisni su za rast i razvoj organizama (npr. Fe, Mn, Zn, Co), neki imaju toksičan efekt (Hg, Pb, Cd), dok je za bakar karakteristično da, ovisno o biodostupnoj koncentraciji, može imati pozitivan i negativan učinak. Tragovi metala utječu na primarnu produkciju, metabolizam, rast i razmnožavanje fitoplanktona, dok fitoplankton regulira distribuciju, kemijsku specijaciju i kruženje tih metala u moru.

Kemijska specijacija tragova metala označava definiranje i kvantificiranje kemijskih vrsta u kojima je metal prisutan u moru. U moru se najveća pozornost pridaje kemijskoj specijaciji željeza i bakra jer kao mikronutrijenti imaju ključnu ulogu u reakcijama fotosinteze koja je temelj prehrambenog lanca. Kako je više od 99,9 % bakra u morskoj vodi vezano u organskim kompleksima, interakcija s autohtonim, kao i atmosferom ili rijekama donesenim organskim ligandima u najvećoj mjeri kontrolira njegov utjecaj na morski život. Da bi se istražila interakcija bakra s organskim ligandima određuje se koncentracija organskih liganada koji imaju afinitet za njegovo vezanje u inertan kompleks odnosno kapacitet kompleksiranja bakra (engl. *copper complexing capacity*, CuCC). Jedna od najosjetljivijih metoda za određivanje CuCC je voltametrijia s anodnim otapanjem metala (engl. *anodic stripping voltammetry*, ASV).

U radu će biti prikazani rezultati za parametre kapaciteta kompleksiranja bakra (broj razreda liganada, njihove koncentracije i prividne konstante stabilnosti nastalih kompleksa) koji su određeni za površinski mikrosloj mora i potpovršinsku vodu srednjeg Jadrana za razdoblje veljača – srpanj 2019. godine u razdoblju izražene oligotrofije.

Pratit će se utjecaj specifičnog atmosferskog donosa poput otvorenog požara, Saharske prašine i peludi na navedene parametre CuCC, obogaćenje organskih liganada u mikrosloju mora u odnosu na potpovršinsku vodu, količina organskih liganada u ukupnoj masi otopljenog organskog ugljika te promjena koncentracije organskih liganada s promjenom ukupnog otopljenog bakra. Izračunom parametara CuCC dobit ćemo uvid u količinu bakra koja može biti unesena u more prije nego što se pojavi slobodan, a ujedno i toksičan oblik metala.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Atmosfersko taloženje u more

Atmosfera predstavlja dominantan put za transport prirodnih i antropogenih lebdećih čestica (aerosola) i plinova u kratkom i dugoročnom vremenskom okviru s kontinenta u obalno i otvoreno more⁽¹⁾. Morski fitoplankton (primarni proizvođači) odgovoran je za približno polovicu pretvorbe ugljičnog dioksida u organske molekule putem fotosinteze uz oslobađanje kisika na Zemlji, a za to mu trebaju hranjive tvari koje podržavaju njegov rast i razvoj⁽²⁾. Atmosfersko taloženje predstavlja jedan od glavnih puteva unosa hranjivih tvari u more čime direktno utječe na biogeokemijske procese u moru te na koncentraciju ugljikovog dioksida u atmosferi kao i globalnu klimu. Atmosfersko taloženje u more odvija se turbulentnim miješanjem čestica s površinom mora (suho taloženje) te izravnim taloženjem nakon što se čestica zarobi unutar kapljice oblaka i kiše (mokro taloženje)⁽²⁾⁽³⁾.

Atmosferski aerosol sadrži krute i tekuće lebdeće čestice raspršene u zraku, a čini ga kompleksna smjesa spojeva čiji kemijski sastav ovisi o izvoru i lokaciji emisije te vremenskim i atmosferskim uvjetima u kojima nastaje. Kemijski sastav aerosola generalno čine anorganska i organska komponenta te uključuje anorganske ione, tragove metala, elementarni ugljik te širok spektar organskih spojeva⁽⁴⁾. Procesom taloženja aerosola morska se voda opskrbljuje hranjivim solima (nitrati, nitriti, amonijevi ioni, fosfati), metalima u tragovima i organskom tvari. Neki od metala u tragovima korisni su za rast i razvoj organizama (npr. Fe, Mn, Zn, Co), neki imaju toksičan efekt na organizme (Hg, Pb, Cd), dok je za bakar karakteristično da, ovisno o biodostupnoj koncentraciji, ima pozitivan i negativan učinak⁽³⁾. Bioraspoloživost hranjivih soli i metala u tragovima iz aerosola u moru povezuje se s njihovim kemijskim i mineralnim sastavom te interakcijama i kemijskim transformacijama za vrijeme atmosferskog prijenosa.

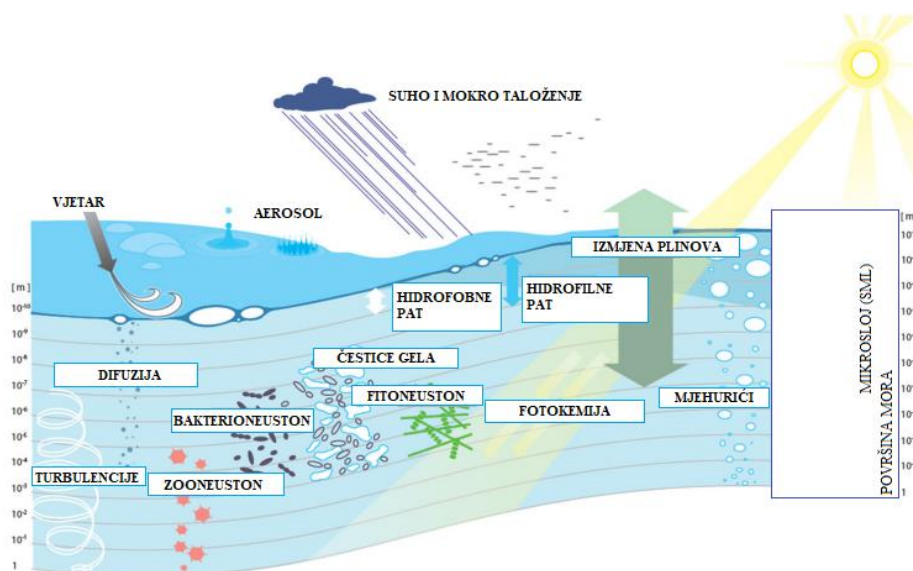
SML je putem procesa taloženja također pod utjecajem atmosferske organske tvari koja u moru zajedno s autohtonom organskom tvari predstavlja najveći izvor ugljika za heterotrofne bakterije čime ima ključnu ulogu u biogeokemijskom ciklusu ugljika⁽⁵⁾.

Odgovor fitoplanktona i heterotrofnih bakterija na atmosfersko taloženje ovisi o trofičkom statusu okoliša u kojem se razvijaju. Atmosferski donos hranjivih soli i metala u tragovima (npr. Fe, Cu) izrazito je bitan u oligotrofnim područjima oceana gdje je primarna produkcija ograničena upravo zbog nedostatka tih hranjivih tvari⁽⁶⁾.

Tako aerosol saharске prašine predstavlja bitan izvor tragova metala i hranjivih soli u Sredozemlju koje je limitirano dušikom i fosforom⁽³⁾⁽⁷⁾. Uz mineralnu prašinu iz pustinjskih područja, najvažniji izvor metala u tragovima u aerosolu predstavlja izgaranje biomase, ugljena te industrijska postrojenja⁽⁸⁾.

2.2. Površinski mikrosloj mora

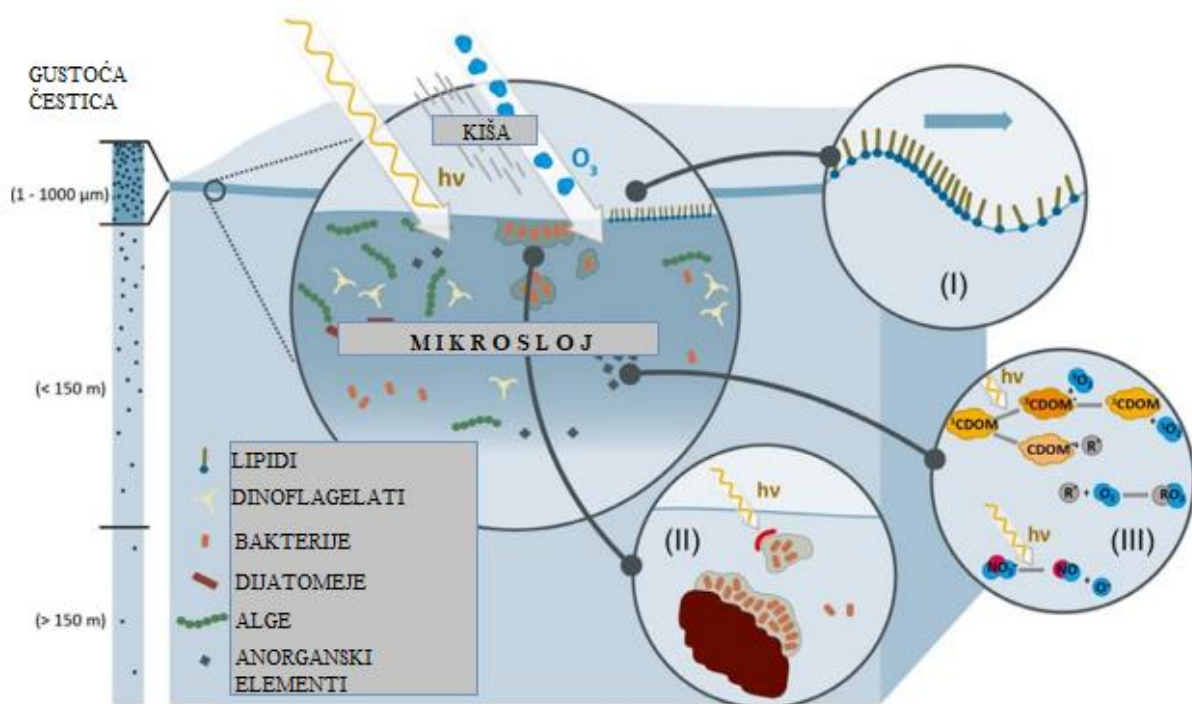
Površinski mikrosloj mora (engl. *sea-surface microlayer*, SML) predstavlja granicu debljine od 10 – 1000 μm između atmosfere i oceana koja pokriva oko 70 % Zemljine površine⁽⁸⁾⁽⁹⁾. Oceani zauzimaju ukupno 362 milijuna km^2 stoga SML predstavlja najveću prirodnu granicu faza na planeti⁽¹⁰⁾. Procesi koji se odvijaju u SML imaju značajnu ulogu u nizu globalnih klimatskih procesa, biogeokemijskih ciklusa, kao i kvaliteti zraka⁽⁸⁾⁽⁹⁾. SML kontrolira ukupnu razmjenu energije i tvari između atmosfere i oceana, te samim time utječe na biogeokemijske procese tvari (Slika 1). Upravo je SML pod direktnim utjecajem atmosferskih čimbenika klimatskih promjena kao što su sunčevo zračenje, klimatski relevantni plinovi, brzina vjetra, količina oborina, ali i antropogenih čimbenika poput donosa hranjivih tvari, toksina, nanočestica, itd, u more⁽¹⁰⁾.



Slika 1. Procesi koji utječu na prijenos tvari i energije kroz SML⁽¹⁰⁾

Za razliku od SML, potpovršinska voda (engl. *underlying water*, ULW) nije direktno izložena sunčevom zračenju zbog smanjenog prodora količine svjetlosti s povećanjem dubine. Dok razina svjetlosti u SML uvijek prelazi 98 % zračenja, u moru s velikom količinom organske tvari samo oko 10 % površinskog UV-B zračenja dosegne od 0,2 – 5 m dubine⁽¹¹⁾.

Iako je ukupni volumen SML vrlo malen u usporedbi s ostatkom vode u oceanima, unutar njega događaju se jedinstvene međufazne reakcije koje ili nisu značajne u slojevima ispod SML ili će se tamo odvijati znatno sporije. Zbog najveće moguće izloženosti sunčevom zračenju, SML predstavlja biokemijski mikroreaktor te zajedno s pripadajućim površinskim slojem (do 5 cm) predstavlja svojevrsni inkubator širokog spektra vodenih organizama⁽⁸⁾.



Slika 2. Površinski mikrosloj mora (SML) kao svojevrsni biokemijski reaktor⁽⁸⁾

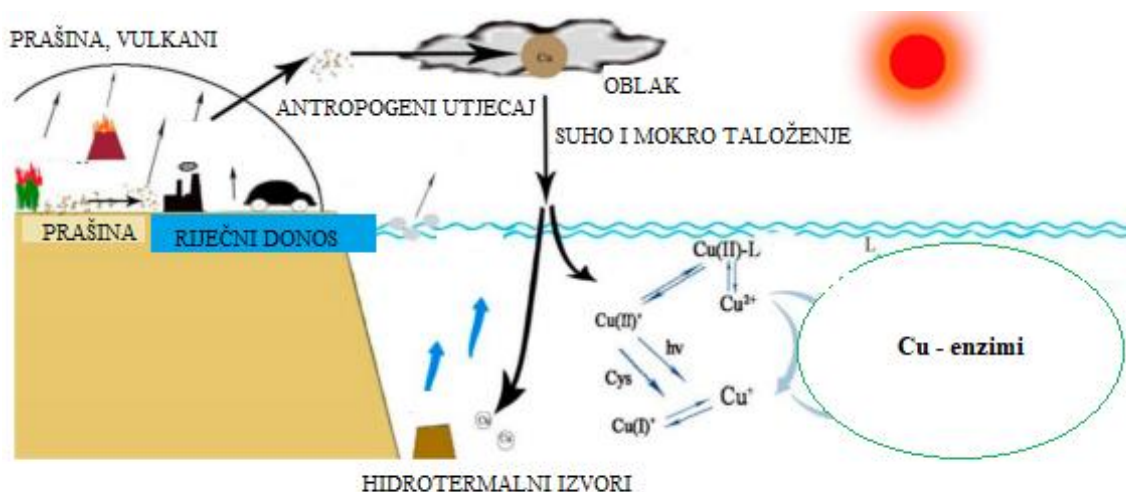
Primarna proizvodnja fitoplanktona ovisi o sunčevom svjetlu, ali prekomjerna količina zračenja može za posljedicu imati inhibiciju fotosinteze. Procesi primarne proizvodnje i staničnog disanja imaju izravan utjecaj na koncentraciju i protok kisika. Metabolička aktivnost organizama, posebno mikroorganizama, određuje proizvodnju, razgradnju i modifikaciju organskog materijala u SML.

SML je specifično područje vodenog stupca u kojem dominiraju adsorbirane površinski aktivne tvari (PAT) koje smanjuju površinsku napetost na granici voda – atmosfera. Kemijski sastav PAT uključuje velik broj polisaharida, polipeptida, lipida, ugljikohidrata, aminokiselina, kao i bogatstvo mikrobnih zajednica⁽⁸⁾.

Proteini, polisaharidi i humini kvantitativno dominiraju u SML, ali prisustvo lipida, ftalata i aromatskih ugljikovodika u niskim koncentracijama ima također znatan utjecaj na njegova fizikalno – kemijska svojstva. SML također može biti obogaćen tragovima metala (npr. Cu, Pb, Zn) koji mogu formirati komplekse s organskom tvari te tako regulirati svoj biogeokemijski ciklus, biodostupnost i potencijalnu toksičnost. Kemijski sastav SML i čimbenici obogaćivanja pojedine tvari vremenski se i prostorno razlikuju te su ovisni o stanju morskog sustava, režimu vjetra, godišnjem dobu te antropogenom donosu⁽⁹⁾.

2.3. Bakar u morskoj vodi

Bakar (Cu) se u more unosi rijekama, mokrim i suhim atmosferskim taloženjem, hidrotermalnim otvorima te resuspenzijom iz sedimenta (Slika 3). Izvori bakra mogu biti prirodni kao što su vulkani, pustinjska prašina, hidrotermalni otvori i sedimenti, te antropogeni poput prometa i industrije (Slika 3)⁽¹⁾.



Slika 3. Unos, prijenos i transformacija Cu u morskom okolišu⁽¹⁾

Koncentracija otopljenog bakra u oceanu je u rasponu od 0,2 nM u površinskim slojevima do 4 nM u dubljim slojevima. U obalnim morima prosječna koncentracija otopljenog bakra iznosi od 1 - 100 nM⁽¹²⁾.

Ukupna koncentracija bakra je u moru raspodijeljena između različitih fizičko-kemijskih vrsta u otopljenoj (<0,45 μm) i čestičnoj (>0,45 μm) frakciji:

$$[\text{Cu}]_u = [\text{Cu}^{2+}] + \Sigma[\text{CuX}_i] + \Sigma[\text{CuL}_i] + \Sigma[\text{Cu}_{\text{čest}}]$$

gdje je

$[\text{Cu}^{2+}]$ – koncentracija slobodnog iona Cu^{2+}

$\Sigma[\text{CuX}_i]$ – ukupna koncentracija anorganskih kompleksa Cu

$\Sigma[\text{CuL}_i]$ – ukupna koncentracija organskih kompleksa Cu

$\Sigma[\text{Cu}_{\text{čest}}]$ – ukupna koncentracija kemijskih vrsta Cu vezanih na čestice.

Otopljeni bakar u moru postoji u obliku slobodnih hidratiziranih iona (Cu^{2+}), anorganskih kompleksa sa sulfidima, kloridima, hidroksidima, arsenidima i karbonatima (CuX_i) te kompleksa s organskim ligandima (CuL_i)⁽¹²⁾. Metal uglavnom ulazi u biološke stanice u ionskom obliku kroz ionske kanale te se labilna anorganska frakcija (Cu^{2+} i CuX_i) uglavnom smatra bioraspoloživom⁽¹³⁾⁽¹⁴⁾.

Biološki procesi imaju snažan utjecaj na raspodjelu elemenata u tragovima u moru koji imaju funkciju hranjivih tvari (Fe, Mn, Zn, Cu, Co, Cd). Interakcija između tih metala u tragovima i morskog fitoplanktona je uzajamna: tragovi metala utječu na primarnu produkciju, metabolizam, rast i razmnožavanje fitoplanktona jer imaju ključnu ulogu u asimilaciji glavnih hranjivih makroelemenata (N, Si, P i C)⁽¹⁵⁾, dok fitoplankton ima značajan učinak na distribuciju, kemijsku specijaciju i kruženje tih metala u moru⁽¹⁶⁾. Zbog uzajamne interakcije između bakra i morskog fitoplanktona sezonske se promjene u specijaciji bakra djelomično pripisuju varijacijama u sastavu fitoplanktona⁽¹⁾. Kemijska specijacija, odnosno raspodjela kemijskih vrsta metala u morskom okolišu važna je za razumijevanje njihove toksičnosti, reaktivnosti i biogeokemijskog ponašanja.

Specijacija brojnih metalnih iona kontrolirana je interakcijom s organskim ligandima putem stvaranja kompleksa, čime se kontrolira njihova bioraspoloživost odnosno toksičnost⁽¹⁷⁾.

Više od 99,9 % otopljenog bakra u morskoj vodi vezano je s organskim ligandima u otopljene, niskomolekularne organske komplekse⁽¹⁸⁾ koji smanjuju koncentraciju slobodnog hidratiziranog Cu^{2+} do vrlo niskih razina (0,001 – 10 pM), dok bi u njihovoj odsutnosti koncentracije Cu^{2+} dosezale više vrijednosti (500 pM) koje su toksične za određene vrste morskog fitoplanktona⁽¹⁾.

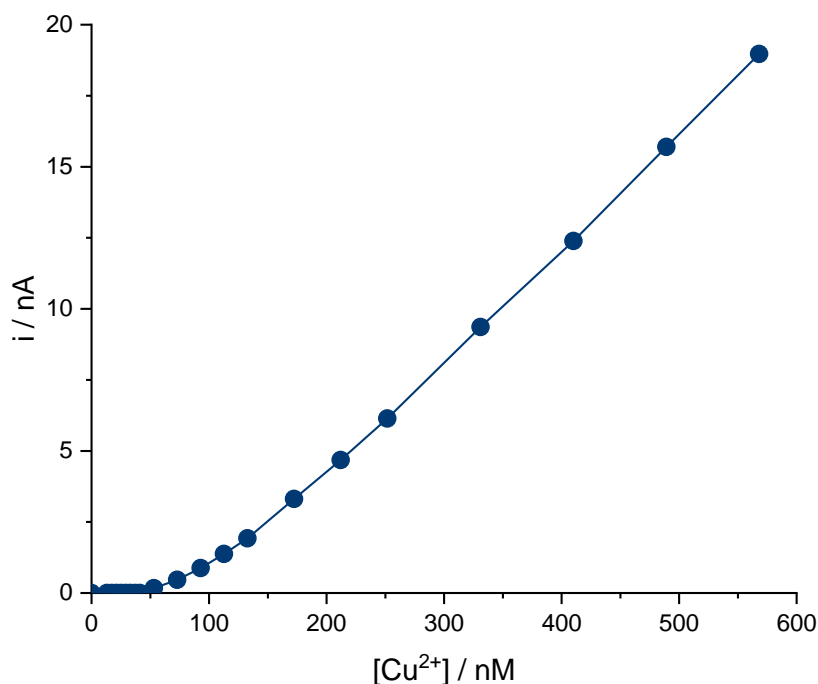
Pošto biota predstavlja glavni izvor organskih liganada koji veže bakar smatra se da povećanjem količine bakra u morskoj vodi raste i količina izlučenih organskih liganada. Veliki utjecaj na kompleksiranje bakra s organskim ligandima imaju i abiotski čimbenici kao što su pH i temperatura⁽¹⁶⁾.

2.4. Kapacitet kompleksiranja metala (MCC)

Kapacitet kompleksiranja metala (engl. *metal complexing capacity*, MCC) predstavlja ukupnu koncentraciju organskih liganada koji imaju afinitet za vezanje određenog metalnog iona u inertan kompleks.

Kapacitetu kompleksiranja određenog metala doprinose organski ligandi koji imaju različitu jakost vezanja metala, a za interpretaciju MCC najčešće se koristi „diskretni model“ prema kojem su organski ligandi grupirani na temelju sličnih afiniteta funkcionalnih skupina za vezanje metala. Ukupna sposobnost tih liganada za vezanje metalnog iona izražava se preko uvjetne konstante stabilnosti⁽¹⁹⁾. MCC obično ne daje informaciju o strukturi liganada niti kompleksa već su koncentracije pojedinih razreda liganada (L_i) te njihove uvjetne konstante stabilnosti (K) glavni parametri za MCC. Pritom je K određena za fizikalno-kemijske uvjete (pH, temperatura, ionska jakost) u analiziranom uzorku vode. Operativna podjela bakrovih kompleksirajućih liganada navodi se prema jakostima uvjetnih konstanti stabilnosti, te prema tome razlikujemo dvije klase liganada: jaki ligandi (L_1) s vrijednostima $\log K$ 12 – 14 i koncentracija u rasponu od 1 – 40 nM, te slabi ligandi (L_2), s vrijednostima $\log K$ 8 – 10 i koncentracija u rasponu od 6 – 150 nM⁽²⁰⁾. Za određivanje specijacije metala u tragovima poput bakra čija je koncentracija u morskoj vodi vrlo niska ($< \text{nM}$) potrebno je koristiti vrlo osjetljive elektrokemijske metode s pretkoncentracijskim korakom. Jedna od najčešćih metoda korištenih za određivanje parametara CuCC je voltometrija s anodnim otapanjem metala (engl. *anodic stripping voltammetry*, ASV) uz statičnu živinu kap kao radnu elektrodu.

Postupak određivanja CuCC parametara sastoji se od dodavanja standardne otopine Cu^{2+} u uzorak pri prirodnom pH i mjerenja strujnog odziva sve dok nagib krivulje ovisnosti struje vrha pika o koncentraciji ukupnog Cu^{2+} u uzorku ne postane konstantan (Slika 4)⁽²¹⁾.



Slika 4. Titracijska krivulja kapaciteta kompleksiranja bakra u uzorku

Prema prikazanoj titracijskoj krivulji koncentracija organskih liganada koji kompleksiraju s Cu^{2+} u uzorku veća je od prirodno prisutne koncentracije metala jer se devetim dodatkom standardne otopine Cu^{2+} počelo izlaziti iz područja kapaciteta. Prije te točke se svaka dodana koncentracija Cu^{2+} raspodijelila između inertnih organskih kompleksa (CuL_i) koji se ne reduciraju pri odabranom potencijalu akumulacije i labilnih vrsta (anorganskih i nekih slabih organskih kompleksa, CuX_i) koji su elektroaktivni.

Tijekom akumulacije dolazi do selektivne redukcije Cu^{2+} iz labilnih vrsta CuX_i pri čemu nastaje amalgam:



a prilikom „stripping“ koraka dolazi do reoksidacije Cu^0 :



Zbog visoke koncentracije kloridnih iona u morskoj vodi (~0,55 M) oksidacijom nastaje $[\text{CuCl}_2]^-$.

U literaturi je dostupno nekoliko interpretacija dobivenih titracijskih krivulja na način da se eksperimentalni podaci iz titracijske krivulje uklope u odgovarajući matematički model na temelju čega se izračunavaju parametri za CuCC.

Najpoznatiji su Ružić-van den Berg⁽¹⁹⁾⁽²²⁾ i Scatchard⁽²³⁾ linearizacijski modeli te Langmuir/Gerringa⁽²⁴⁾ nelinearni model. Prema „diskretnim“ mjestima vezanja metala u prirodnom uzorku ovi modeli pretpostavljaju da jedan, dva ili tri razreda liganada (L_i) formiraju 1:1 metal:ligand kompleks. Iz toga slijedi stvaranje kompleksa prema sljedećoj jednačbi:



Uvjetna konstanta stabilnosti dana je izrazom:

$$K = \frac{[\text{ML}_i]}{[\text{M}] \cdot [\text{L}_i]} \quad (4)$$

gdje je $[\text{M}]$ – suma svih ravnotežnih koncentracija odgovarajućih vrsta metala osim $[\text{ML}_i]$ (odnosno $[\text{M}]$ je „nađena“ koncentracija metala), a $[\text{ML}_i]$ je koncentracija kompleksa metala s organskim ligandom L_i . Nadalje, ukupna koncentracija liganada c_L u otopini je zbroj $[\text{ML}_i]$ i $[\text{L}_i]$:

$$c_L = [\text{ML}_i] + [\text{L}_i] \quad (5)$$

Dalje slijedi:

$$[\text{ML}_i] = c_L - [\text{L}_i] \quad (6)$$

Uvrštavanjem izraza za $[\text{L}_i]$ iz (4) u (6) dobiva se:

$$[\text{ML}_i] = c_L - \frac{[\text{ML}_i]}{K [\text{M}]} \quad (7)$$

Sređivanjem ove jednačbe dobiva se izraz za Ružić-van den Berg linearizacijski model:

$$\frac{[\text{M}]}{[\text{ML}_i]} = \frac{[\text{M}]}{c_L} + \frac{1}{K c_L} \quad (8)$$

Ova jednačba transformira titracijsku krivulju u pravac ovisnosti $[\text{M}]/([\text{ML}_i])$ o $[\text{M}]$ pri čemu se iz nagiba dobivenog pravca ($1/c_L$) izračuna ukupna koncentracija liganada, dok se iz odsjeka na ordinati ($1/K'c_L$) odredi vrijednost uvjetne konstante stabilnosti.

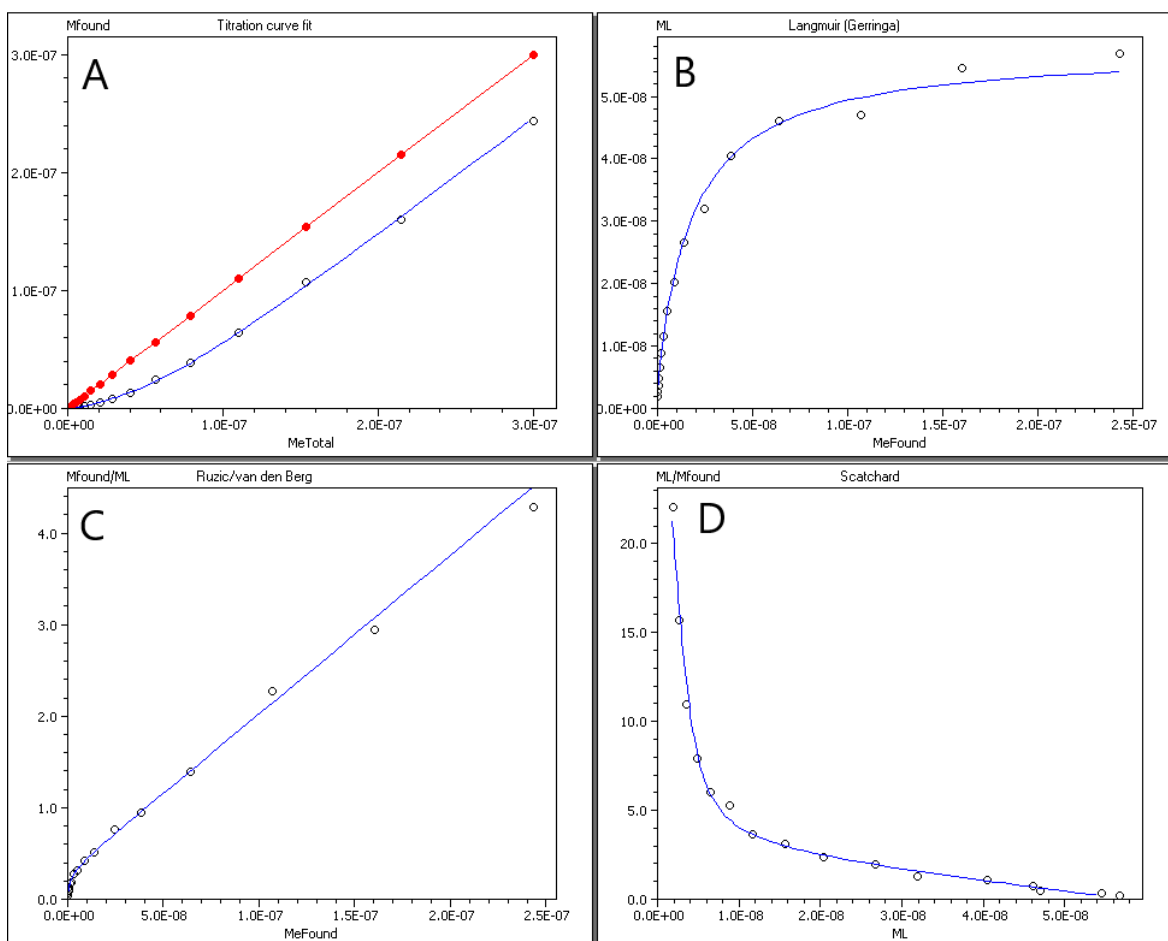
Konačan izraz za Scatchardov linearni model daje ovisnost omjera vezanog metala i slobodnog metala o vezanom metalu:

$$\frac{[ML_i]}{[M]} = -K [ML_i] + K [L_i] \quad (9)$$

Langmuir/Gerringa model adsorpcijske izoterme prikazuje ovisnost stupnja vezanja metala o slobodnom metalu:

$$[ML_i] = \frac{K[L_i][M]}{1+K[M]} \quad (10)$$

Svi navedeni transformacijski modeli ugrađeni su u matematički program ProMCC⁽²¹⁾ te se vrlo lako primjenjuju za računanje parametara MCC.



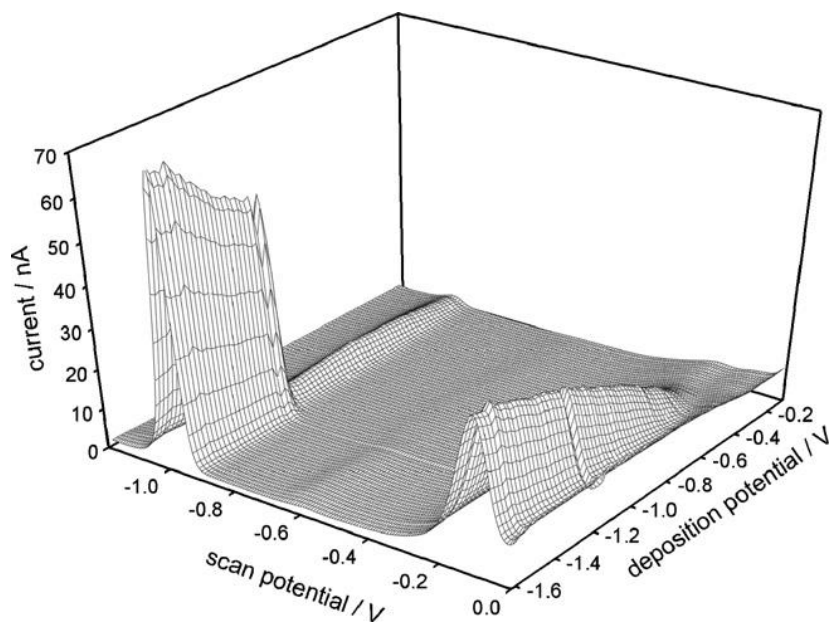
Slika 5. Interpretacija titracijske krivulje u ProMCC programu: A) izvorna titracijska krivulja uzorka (plavo) i zakiseljenog i UV svjetlu izloženog alikvota (crveno), matematičke transformacije prema B) Langmuir/Gerringa, C) Ružić-van den Berg i D) Scatchard modelu⁽²¹⁾

Kod određivanja parametara MCC ASV tehnikom važan je odabir potencijala akumulacije - potencijala kod kojeg će se selektivno reducirati sav slobodan i labilno vezan metal, ali ne i inertni kompleksi istog metala, a taj odabir vrši se na temelju snimljenog pseudopolarograma.

2.5. Pseudopolarografija

Pseudopolarografija je elektroanalitička metoda prikladna za razlikovanje elektrokemijski labilnih i inertnih kompleksa otopljenih tragova metala u njihovim prirodnim koncentracijama ($<10^{-8}$ M) s organskim ligandima⁽²⁵⁾. Ova tehnika ne zahtjeva dodatak novog liganda koji bi potencijalno promijenio prirodnu ravnotežu unutar otopine te na taj način omogućuje proučavanje stvarnih kompleksa metala⁽²⁶⁾.

Posebno se može primijeniti za specijaciju metala u tragovima koji tvore amalgam (Cu, Cd, Zn i Pb) koristeći voltametriju s anodnim otapanjem. Glavni parametri korišteni za specijaciju metala u tragovima pomoću pseudopolarografskih podataka su poluvalni potencijal i granična struja⁽²⁵⁾. Pseudopolarografija uključuje izvođenje niza uzastopnih ciklusa ASV pri različitim potencijalima akumulacije⁽²⁷⁾. Kao rezultat dobivamo voltamograme koji sigmoidalno ovise o potencijalu akumulacije i analogni su klasičnom polarogramu pa su nazvani pseudopolarogrami (Slika 6).



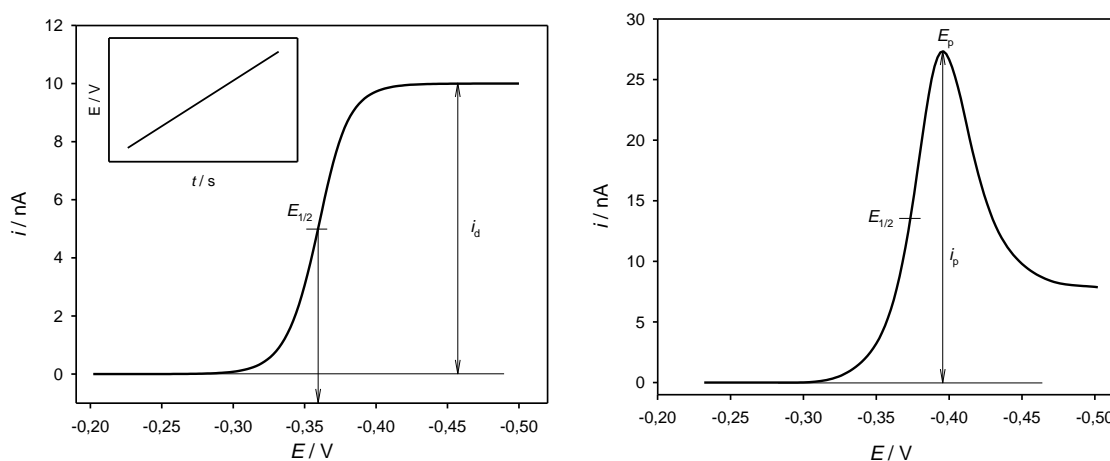
Slika 6. Voltamogrami dobiveni pri snimanju pseudopolarograma⁽²⁷⁾

Ovakve krivulje odražavaju termodinamička i kinetička svojstva kompleksa i pomaknute su prema negativnijim potencijalima akumulacije prilikom smanjenja koncentracije iona slobodnog metala. Veličina pomaka izravno je povezana s termodinamičkom konstantom stabilnosti kompleksa na način da je kompleks stabilniji što je poluvalni potencijal sigmoidalne krivulje negativniji⁽²⁶⁾.

Termodinamička konstanta stabilnosti može se izračunati iz razlike standardnih potencijala redoks reakcija slobodnog i inertno kompleksiranog metala, a ovakav se teorijski koncept uspješno primjenjuje za specijaciju metala u tragovima u prirodnim vodenim sustavima⁽²⁵⁾.

2.6. Voltometrija

Voltometrija je naziv za skupinu elektroanalitičkih metoda u kojima je signal pobude električni napon, a signal odziva struja mjerena kao funkcija narinutog napona. Otuda i naziv voltometrija kao skraćenica za *volt – amper – metrija*. Voltometrija se razvila iz polarografije te je tumačenje signala odziva voltometrije analogno signalu odziva klasične polarografije. Razlika je u tome što se u voltometriji koristi elektroda stalne površine, a u polarografiji se koristi isključivo kapajuća živina elektroda kojoj se radna površina neprestano obnavlja i mijenja tijekom samog mjerenja.



Slika 7. (1) Klasični polarografski val dobiven uz linearnu promjenu potencijala (detalj na slici), (2) voltometrijska krivulja struja – potencijal (uz linearnu promjenu potencijala s vremenom)

Negativiranjem potencijala elektrode dolazi do depolarizacije elektrode redukcijom određenog depolarizatora prisutnog u otopini, pri čemu, ukoliko je metal topljiv u živi, nastaje amalgam:



gdje su O oksidirani oblici, R reducirani oblici, a z broj elektrona u reakciji.

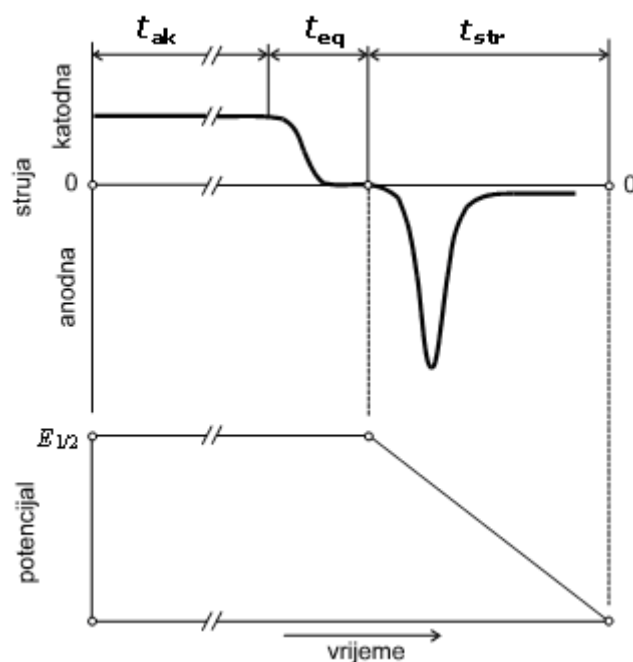
Obzirom na niske koncentracije tragova metala u prirodnim vodama, najosjetljivije metode pri analizi tragova metala su tehnike s pretkoncentriranjem poput već spomenute ASV i adsorptivne voltametrije s katodnim otapanjem (engl. *adsorptive cathodic stripping voltammetry*, AdCSV). Prag detekcije spomenutih metoda doseže i do 10^{-12} M. Obje metode obuhvaćaju akumulaciju analiziranog metala (u ASV) ili inertnog kompleksa (u AdCSV) na radnu elektrodu koja je obično od žive zbog dobro definirane i obnovljive površine i mogućnosti rada u širokom području negativnih potencijala.

2.6.1. Diferencijalno pulsna voltametrija anodnog otapanja metala (DPASV)

Najpoznatija metoda za kvantifikaciju tragova metala koji sa živinom elektrodom stvaraju amalgam (Cu, Cd, Zn, Pb) je ASV. Primjenjuje se za određivanje niskih koncentracija metala u prirodnim vodama i sedimentu. Metoda ASV se sastoji od tri koraka (Slika 8):

- pretkoncentracijski korak (akumulacija) - metalni ion se akumulira na živinoj radnoj elektrodi na određenom potencijalu (oko 100 - 200 mV negativnijem od redoks potencijala labilnog metala⁽²¹⁾), pri čemu se otapa u živi stvarajući amalgam
- smirivanje otopine - potrebno zbog ujednačavanja koncentracije nastalog amalgama u živi
- reoksidacija (anodno otapanje) - reducirani metal se oksidira iz amalgama promjenom potencijala u anodnom smjeru, te se mjeri struja (signal odziva) kao funkcija potencijala.

Osjetljivost uvelike ovisi o vrsti pobudnog signala. Većoj osjetljivosti doprinosi primjena pulsne pobude kao što je pravokutnovalni ili diferencijalno pulsni signal.



Slika 8. Princip voltametrije s anodnim otapanjem, t_{ak} – vrijeme akumulacije (uz miješanje), t_{eq} – vrijeme smirivanja (bez miješanja) i t_{str} – vrijeme anodne oksidacije (bez miješanja)

Pošto prirodni uzorak vode sadrži različite organske molekule (ligande) koji s ispitivanim metalom stvaraju stabilne komplekse, za određivanje ukupne koncentracije metala potrebno je prije same analize adekvatno pripremiti uzorak: zakiseliti na $\text{pH} < 2$ s kiselinom visoke čistoće (poput HNO_3 , *suprapure*) te ga izložiti UV zračenju kako bi se razorili prisutni kompleksi i ligandi te tako oslobodio metal iz kompleksa. Određivanje ukupne koncentracije metala u uzorku vrši se metodom standardnog dodatka, te se linearnom regresijom dobivenih vrijednosti vršnih struja (i_p) prema koncentraciji dodanog metala izračuna koncentracija metala prisutna u samom uzorku. ASV metodom mogu se određivati samo metali koji sa živom stvaraju amalgam: Zn, Cd, Pb, Cu, Sn, Bi, Sb, Tl, Ga, In i Mn. Granice kvantifikacije određene ASV-om za Zn, Cd, Pb i Cu su 10 ng/L, 1 ng/L, 2 ng/L i 5 ng/L⁽²⁸⁾. Metali poput Se, Hg, Ag, Te i As mjerljivi su na krutoj ugljičnoj ili zlatnoj elektrodi⁽²⁹⁾ ili AdCSV.

Procesom akumulacije redovito povećavamo koncentraciju metala u živi za najviše 1000 puta u odnosu na koncentraciju u analiziranoj otopini. Količina metala (n) izlučenog na radnoj elektrodi dana je izrazom:

$$n = \frac{i_d t_i}{zF} \quad (12)$$

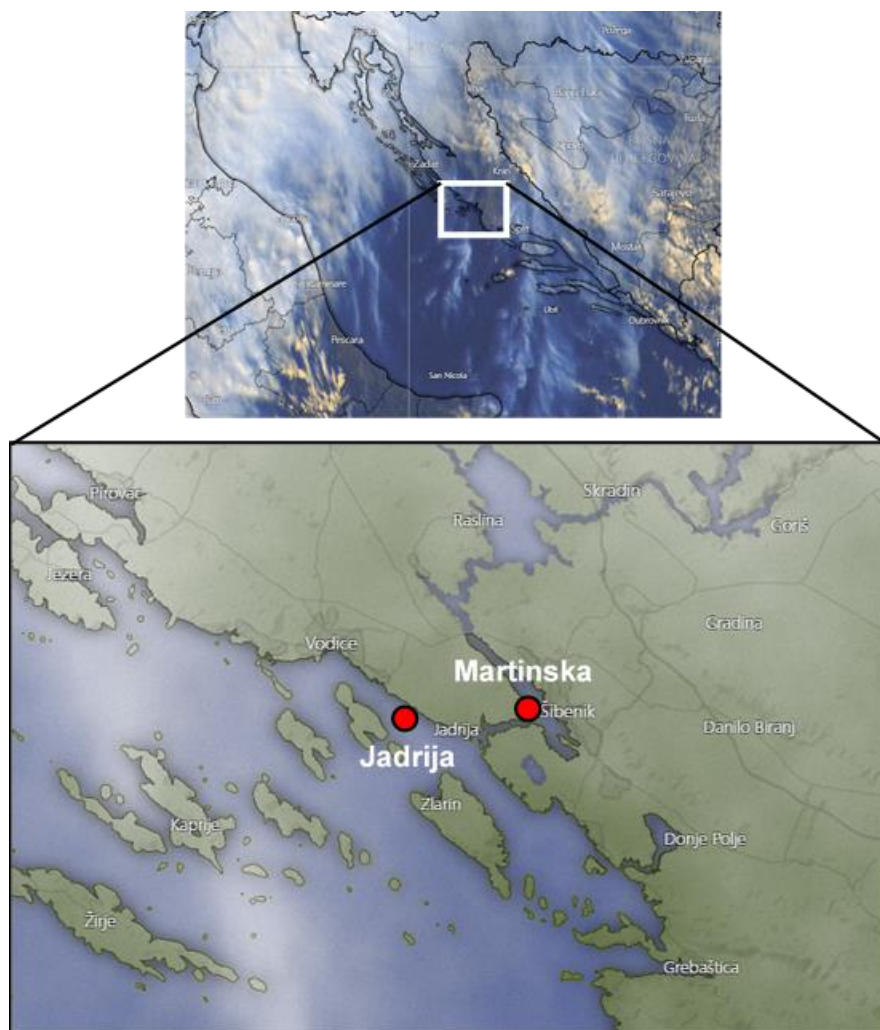
Gdje je t_i vrijeme akumulacije, i_d granična struja, z broj elektrona i F Faraday – eva konstanta. Pretpostavimo li jednoličnu koncentraciju metala u živi, ona je u živinoj kapi polumjera r jednaka:

$$c = \frac{i_d t_i}{zF \frac{4}{3} \pi r^3} \quad (13)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Uzorkovanje i priprema uzoraka

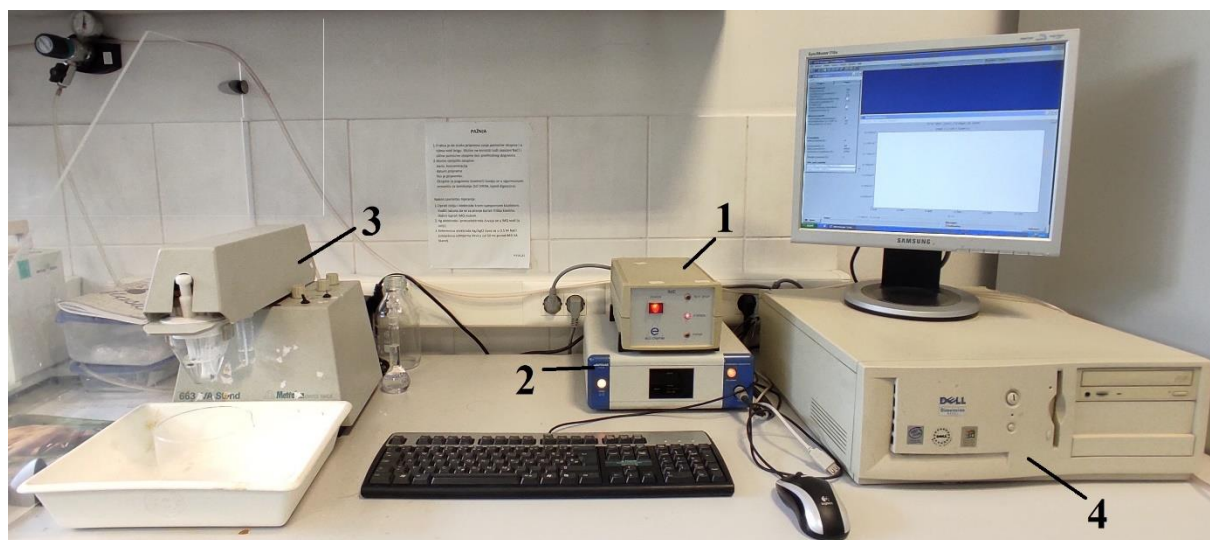
U radu su analizirani uzorci površinskog mikrosloja mora (SML) i potpovršinske vode (ULW) uzorkovani u obalnom dijelu srednjeg Jadrana na postajama Jadrija (J, 43°43'45.8"N 15°48'48.7"E) i Martinska (M, 43°44'09.7"N 15°52'41.8"E) (Slika 9). Uzorci SML su sakupljeni pomoću električnog rotirajućeg bubnja od pleksiglasa te stavljeni u PE boce, dok su uzorci ULW sakupljeni na oko 1 m dubine u PE boce. PE boce su prethodno oprane 10 %-tnom otopinom HNO₃ i dobro isprane MQ vodom. Uzorci su odmah smrznuti (-20 °C, ISO 5667 – 3:1994) te su prije samog mjerenja odmrznuti preko noći u hladnjaku (+4 °C). Svaki je uzorak (25 mL) pomoću šprice profiltriran kroz celulozno acetatni (CA) filter veličine pora 0,45 μm (Sartorius) da bi se odvojile čestice od otopljene organske tvari. Filteri su prije korištenja isprani sa 180 mL MQ vode te 180 mL UV-tretirane morske vode.



Slika 9. Obalno područje srednjeg Jadrana s postajama Martinska i Jadrija

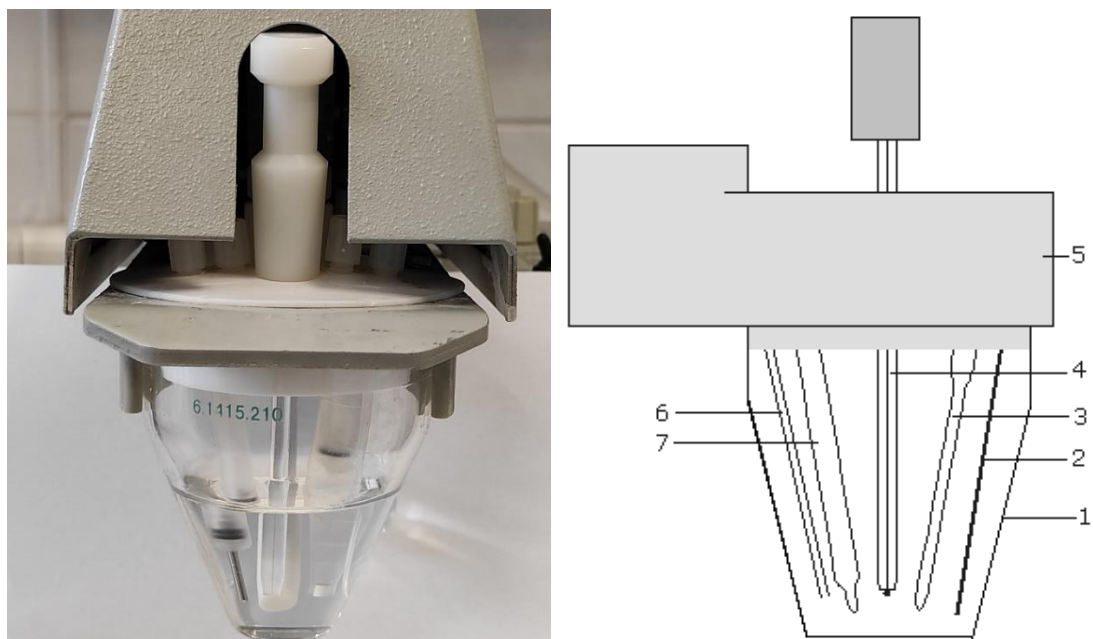
3.2. Instrumentacija i pribor

Sva elektrokemijska mjerenja provedena su pomoću μ AUTOLAB tip II potenciostata/galvanostata, troelektrodnog sustava 663VA Stand (Metrohm, Herisau, Švicarska) te IME (engl. *Interface for Mercury Electrode*) modula koji ih povezuje (Slika 10). Instrumentnim sustavom upravljalo se putem osobnog računala uz pomoć programskog paketa GPES 4.9 (engl. *General Purpose Electrochemical System*) koji omogućuje primjenu velikog broja elektrokemijskih metoda kao što su voltometrija, potenciometrija, amperometrija, itd.



Slika 10. (1) IME modul, (2) Elektrokemijski instrument μ AUTOLAB, (3) elektrodni sustav 663VA Stand te (4) osobno računalo korišteni u mjerenjima

Elektrokemijska mjerenja napravljena su u staklenoj mjernoj posudi (ćeliji) radnog volumena otopine 25 mL u koju su bili uronjeni: staklena kapilara sa živom, protuelektroda, referentna elektroda, cjevčica za ulaz inertnog plina dušika te rotirajuće teflonsko miješalo (Slika 10). Ćelija ima teflonski poklopac s otvorima za navedene elektrode, cjevčicu i miješalo te jedan otvor kroz koji se može dodavati standardna otopina, namjestiti bireta ili pH elektroda. Radna elektroda je bila viseća živina kap (engl. *static mercury drop electrode*, SMDE) površine $0,52 \text{ mm}^2$. Kao referentna elektroda korištena je komercijalna Ag/AgCl (3M KCl) te su svi mjerni potencijali izraženi prema njoj. Kao protuelektroda korišten je štapić od staklastog ugljika (engl. *glassy carbon*, GC). Protuelektroda i radna elektroda zatvaraju strujni krug u elektrolitnoj otopini.



Slika 11. Lijevo: elektrodni sustav korišten u eksperimentu, desno: shematski prikaz elektrodnog sustava: 1-elektrokemijska ćelija, 2-protuelektroda, 3-referentna elektroda, 4-staklena kapilara, 5-držač od teflona, 6-cjevčica za dovod dušika, 7-rotirajuće teflonsko miješalo

Svi koraci u mjerenju koji uključuju stvaranje nove živine kapi kao obnovljive i čiste radne elektrode, miješanje te propuštanje dušika kroz elektrolit automatski su kontrolirani računalom.

Ostala oprema korištena tijekom eksperimentalnog rada bila je:

- analitička vaga, Mettler – Toledo, XS205 (Švicarska)
- UV lampa (150 W srednjetačna Hg lampa, Hanau, Njemačka)
- mikropipete Research Plus (Eppendorf), (0,2 – 20) μL , (10 – 100) μL , (10 – 1000) μL , (1-5) mL
- odmjerne tikvice, laboratorijske čaše

3.3. Uvjeti i način mjerenja

Sva voltametrijska mjerenja provedena su DPASV u sljedećim uvjetima:

- korak potencijala (ΔE) = 4,05 mV
- amplituda impulsa (a) = 25,02 mV
- vrijeme trajanja impulsa = 0,05 s
- vrijeme između impulsa = 0,61 s

Ostali uvjeti mjerenja (potencijal akumulacije (E_a) i vrijeme akumulacije (t_a)) izabrani su na temelju uvodnih eksperimenata te su navedeni u opisu svake slike.

Otopljeni kisik u uzorcima uklanjan je propuštanjem inertnog plina dušika kroz otopinu u trajanju od 5 minuta. Tijekom propuštanja dušika kroz otopinu i koraka akumulacije otopina je miješana brzinom 3000 okretaja/min. Sva su mjerenja provedena na sobnoj temperaturi (23 ± 1) °C. Za vrijeme dušiciranja osim što dolazi do uklanjanja kisika propuštanjem inertnog plina, dolazi i do uspostavljanja ravnoteže u raspodjeli dodane koncentracije Cu^{2+} unutar uzorka. Slijedi akumulacija metalnog iona u živinu radnu elektrodu pri odabranom potencijalu u određenom vremenu pri čemu dolazi do stvaranja amalgama. Nakon akumulacije se promjenom potencijala u anodnom smjeru mjeri struja oksidacije kao funkcija potencijala.

3.4. Obrada podataka

Podaci dobiveni titracijskim krivuljama (ovisnost vršne struje o potencijalu) su u programu ProMCC matematički transformirani u Ružić-van den Berg, Scatchard i Langmuir/Gerringa model, a posljednji je omogućio određivanje parametara kapaciteta kompleksiranja bakra: koncentraciju pojedinih razreda organskih liganada (L_i) i uvjetnu konstantu stabilnosti (K) inertnog kompleksa. ProMCC je dostupan na web stranici: <https://sites.google.com/site/daromasoft/home/promcc>, a njegova primjena detaljno je opisana u radu⁽²¹⁾.

Svi grafički prikazi pripremljeni su u programu OriginPro, a ukupna koncentracija bakra u pojedinom uzorku i modelnoj otopini aerosola izračunata je pomoću programa StandAdd (<https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-istrazivanje-mora-i-okolisa/Laboratorij-za-fizicku-kemiju-tragova/Clanci/Software/Standard-Addition-Plot>).

Izgled pojedinih voltamograma (Slike 15 B), 16 B), 17 B) te 19) poboljšan je u programu ECDSOFT (<https://www.irb.hr/Zavodi/Zavod-za-istrazivanje-mora-i-okolisa/Laboratorij-za-fizicku-kemiju-tragova/Clanci/Software/ECDSOFT>).

U statističkoj obradi podataka su jakost i smjer linearne korelacije izražene pomoću Pearsonovog koeficijenta korelacije (r) pri čemu je uzeta razina statističke značajnosti $p < 0,05$. Jakost linearne korelacije izražena je ovisno o vrijednosti za r : za $0 < |r| < 0,3$ vrlo slaba ili nikakva povezanost, za $0,3 < |r| < 0,5$ slaba povezanost, za $0,5 < |r| < 0,7$ dobra povezanost i za $0,7 < |r| < 1$ vrlo dobra do izvrsna povezanosti. Ako je vrijednost r pozitivna onda je i korelacija između dvije varijable također pozitivna, a isto vrijedi i za negativne vrijednosti (<https://www.waterquality.gov.au/anz-guidelines/monitoring/data-analysis/correlation-between-variables>, preuzeto 23. 03. 2021. godine).

3.5. Korištene kemikalije i priprema otopina

Tijekom eksperimentalnog rada korištene su sljedeće kemikalije:

- standardna otopina bakrovog (II) nitrata, $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\gamma = 1 \text{ g/L}$, (Merck, Darmstadt, Njemačka)
- Triton-X-100 (T-X-100, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)
- dušična kiselina (HNO_3 , 65 %, analitičke čistoće (*pro analysis*, p.a.) i visoke čistoće (*supra pure*, s.p.) Fisher Scientific, UK)
- bovin serum albumin (BSA, liofiliziran, Sigma-Aldrich, Steinheim, Njemačka)

Za pripremanje razrijeđenih otopina kao i za pranje ćelije i elektrodnog sustava korištena je Milli-Q voda (otpornost $18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Priprema standardnih otopina bakra

Standardna otopina $10^{-4} \text{ M Cu}^{2+}$ dobivena je dodatkom $1000 \mu\text{L } 10^{-3} \text{ Cu}^{2+}$ u $9000 \mu\text{L}$ vode, dok je standardna otopina $10^{-5} \text{ M Cu}^{2+}$ dobivena dodatkom $100 \mu\text{L } 10^{-3} \text{ Cu}^{2+}$ u $9900 \mu\text{L}$ vode.

Za pripremu otopine T-X-100 otopljeno je $0,0836 \text{ g T-X-100}$ u 100 mL vode, $\gamma (\text{T-X-100}) = 0,836 \text{ g/L}$.

Priprema modelnog elektrolita

Elektrolit morske vode (bez organske tvari) pripremljen je filtriranjem morske vode (uzorkovana kraj otoka Visa, stajala u mraku na $+4^\circ\text{C}$ barem 3 mjeseca) kroz $0,7 \mu\text{m}$ staklasti filter (GF/F, Whatman) da bi se uklonila čestična organska tvar. Filtrat s otopljenom organskom tvari zatim je bio izložen 24 h UV zračenju (živina lampa 150 W, Hanau, Njemačka) tijekom kojeg se oksidirala organska tvar i razorili svi organski ligandi. Dobivena je morska voda koja sadrži samo anorganske ione prirodno prisutne u moru (modelni elektrolit).

Priprema modelnih otopina aerosola i BSA

Uzorak aerosola umjetnog požara pripremljen je otapanjem isječka dijela filtera (kruga) promjera $1,7 \text{ cm}$ u 100 mL modelnog elektrolita morske vode. Da bi se metali i organska tvar (adsorbirani na aerosolu nakupljenom na filteru) isprali s filtera, otopina je bila 20 min uronjena u ultrazvučnu kupelj te ostavljena 26 h na $+4^\circ\text{C}$ nakon čega je profiltrirana kroz CA filter veličine pora $0,45 \mu\text{m}$ (Sartorius).

Jedan alikvot filtrata pripremljen je za određivanje ukupnog otopljenog Cu: dodano je 50 μL koncentrirane dušične kiseline (s.p., $\text{pH} < 2$) i izložen je 24 h UV zračenju da bi se oslobodio sav bakar vezan u organskim kompleksima. Uzorak je zatim titriran standardnom otopinom Cu^{2+} . Mjerila se struja u ovisnosti o dodanoj koncentraciji Cu^{2+} te se iz odsječka dobivenog pravca na x-osi izračunala koncentracija ukupnog otopljenog Cu^{2+} u uzorku. Ovaj postupak pripreme uzorka za određivanja ukupne koncentracije bakra proveden je i sa svim SML i ULW uzorcima u skladu s dobro poznatom metodologijom određivanja koncentracije ukupnog metala koji s živinom radnom elektrodom stvaraju amalgam (Cu, Pb, Zn, Cd)⁽³⁰⁾.

Podatak o ukupnoj koncentraciji otopljenog bakra potreban je za određivanje parametara CuCC. Drugi alikvot filtrata, kao i svih uzoraka SML i ULW, titriran je standardnom otopinom Cu^{2+} pri prirodnom pH, a rezultati su prikazani titracijskim krivuljama ovisnosti vršne struje o potencijalu.

Otopina BSA ($\gamma = 5 \text{ mg/mL}$) pripremljena je otapanjem 12,86 mg proteina u 2,5 mL MQ vode. Za titraciju u ćeliji pripremljena je otopina 1 mg/L BSA.

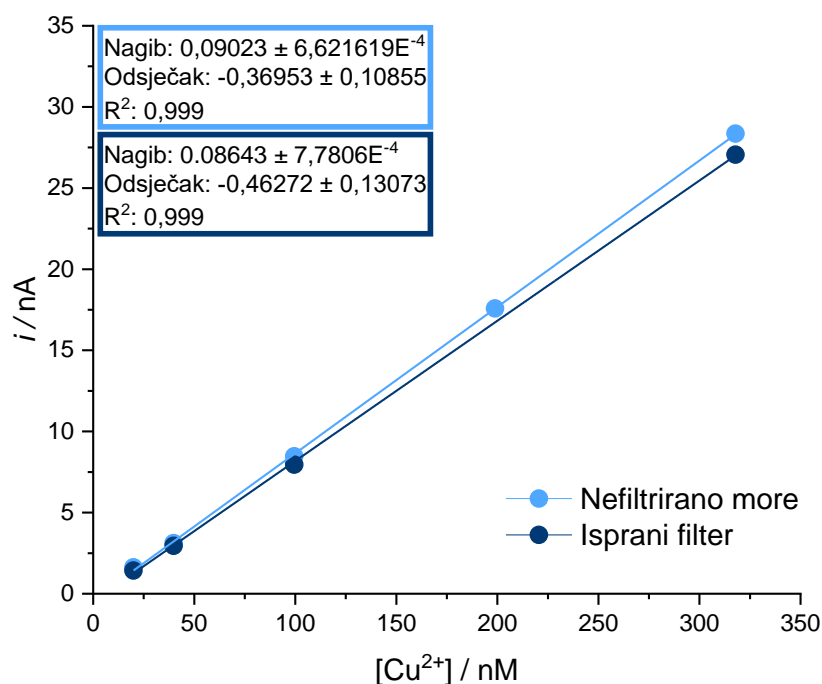
4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Definiranje eksperimentalnih uvjeta mjerenja

U radu su najprije ispitani i odabrani optimalni eksperimentalni uvjeti u kojima su se provela titracijska mjerenja metodom DPASV dodatkom standardne otopine Cu^{2+} u svrhu određivanja parametara CuCC u uzorcima SML i ULW obalnog srednjeg Jadrana. Provjeren je utjecaj ispranog i neispranog CA filtera na struju reoksidacije bakra u pripremljenom elektrolitu morske vode. Pomoću pseudopolarograma odabran je pogodan potencijal E_a pri kojem će se vršiti akumulacija u titracijskim mjerenjima. Na temelju uvodnih eksperimenata odabran je i odgovarajući potencijal desorpcije (E_d) te vrijeme akumulacije (t_a). Prateći ovisnost anodne vršne struje reoksidacije bakra o vremenu akumulacije pri različitim koncentracijama dodane površinski aktivne tvari (neionskog deterdženta T-X-100), odabrana je koncentracija T-X-100 koja će biti dodana svim uzorcima prilikom mjerenja. U odabranim optimalnim eksperimentalnim uvjetima te uz dodatak T-X-100 dobivene su titracijske krivulje koje su prvi korak u određivanju parametara CuCC.

4.1.1. Priprema filtera

Filtriranjem uzoraka kroz CA filter veličina pora $0,45 \mu\text{m}$ uklonjena je prisutna čestična od otopljene organske tvari te su parametri CuCC određeni za dobivenu otopljenu frakciju, jer su svi kompleksi bakra dobro topljivi i nalaze se u toj frakciji. Korištene filtere prije upotrebe potrebno je isprati kako je opisano u eksperimentalnom dijelu (180 mL MQ vode i 180 mL UV izloženo more). Usporedbom titracijske krivulje bakra u nefiltriranom, UV izloženom moru, te u UV izloženom moru profiltriranom kroz prethodno isprani CA filter dobiveni su gotovo identični pravci (Slika 12).



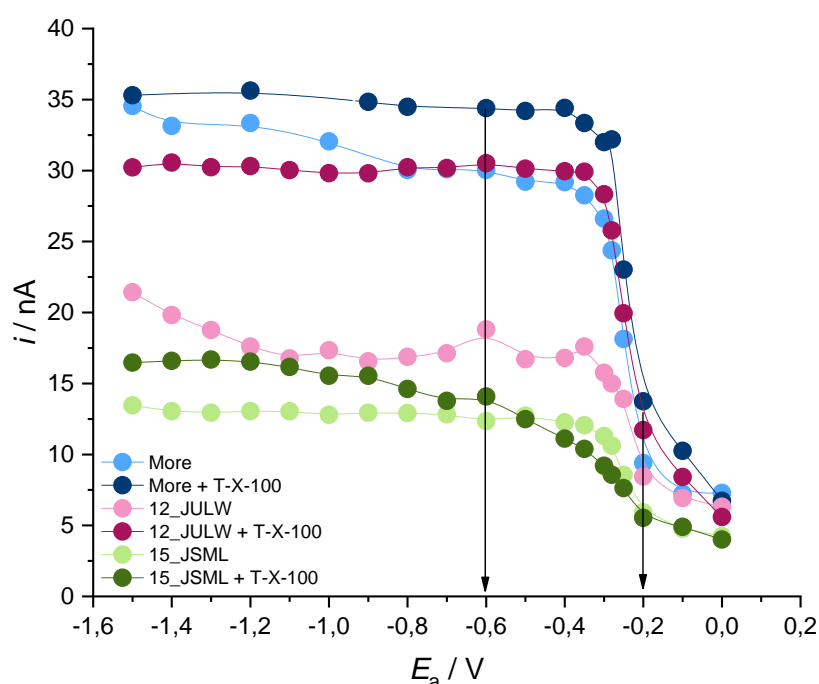
Slika 12. Titracijska krivulja bakra u elektrolitu morske vode bez i nakon filtriranja kroz prethodno isprani CA filter, $E_a = -0,6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1,4$ V.

Na slici je vidljivo da kod manjih i većih koncentracija dodanog bakra u filtriranoj morskoj vodi ne dolazi do povećanja struje u odnosu na nefiltriranu morsku vodu, te zaključujemo da filtriranje uzoraka kroz isprani CA filter neće utjecati na struju bakra u uzorcima. Važno je istaknuti da kod nižih koncentracija bakra nije uočeno zakrivljenje koje bi upućivalo na prisutnost organske tvari i njen kapacitet kompleksiranja bakra nakon filtriranja morske vode.

4.1.2. Pseudopolarografija

Pseudopolarogram prikazuje sigmoidalno oblikovane polarografske valove koji odgovaraju slobodnim ionskim i kompleksiranim vrstama metala. Položaj i oblik pojedinog vala ovisan je o jakosti vezivanja u kompleksu metal – ligand, reverzibilnosti kemijske reakcije i procesu prijenosa elektrona do elektrode⁽²⁷⁾.

Cilj polarografskog mjerenja i prikaza dobivenog rezultata bio je odrediti pogodan potencijal akumulacije (E_a) pri kojem u odabranom vremenu t_a dolazi do selektivne redukcije slobodnog i labilno kompleksiranog bakra, te ispitati utjecaj površinski aktivne tvari (PAT) na elektrokemijsku redukciju bakra. Na Slici 13 je prikazan pseudopolarogram za uzorke mikrosloja mora (15_JSML), potpovršinske vode (12_JULW) te UV izloženog mora, bez i u prisustvu površinski aktivne tvari T-X-100.



Slika 13. Pseudopolarogrami bakra u uzorcima mikrosloja, potpovršinske vode te UV izloženog mora, s i bez T-X-100, [T-X-100] = 1 mg/L, [Cu²⁺] = 560 nM, t_a = 60 s, E_d = -1,4 V

Na svakom je pseudopolarogramu jasno vidljiv jedan val na potencijalu oko -0,2 V (prema Ag/AgCl (3M KCl) elektrodi) gdje dolazi do redukcije labilnih vrsta i slobodnog bakra.

Na potencijalima akumulacije negativnijim od -0,8 V nije uočen drugi val koji bi potjecao od redukcije inertnih kompleksa. Za pogodan potencijal akumulacije obično se uzima onaj koji je malo negativniji od potencijala redukcije labilnih kompleksa, u našem slučaju to je E_a negativniji od -0,3 V. Na temelju dobivenih rezultata mjerenja odabran je potencijal akumulacije -0,6 V pri kojem će se vršiti akumulacija tijekom titracijskih mjerenja metodom DPASV.

Struje pseudopolarografskog vala u uzorku 15_JSML su niže od struja izmjerenih u UV izloženom moru i u uzorku 12_JULW (za dodanih 560 nM Cu²⁺) zbog visoke koncentracije inertnih organskih liganada prisutnih u uzorku 15_JSML koji kompleksiraju bakar (vidi Tablicu 3).

Kod oba navedena uzorka (12_JULW, 15_JSML) jasno se vidi razlika u visini struje pseudopolarografskog vala kod $E_a < -0,6$ V nastala zbog dodatka neionske površinski aktivne tvari, T-X-100. Poznato je da adsorbirani sloj T-X-100 povećava osjetljivost detekcije bakra jer povisuje pik reoksidacije bakra, a pritom ne utječe na njegovu elektrokemijsku redukciju⁽³¹⁾. T-X-100 dodan u uzorke dokazano ima negativan učinak na adsorpciju prisutnih PAT, a pozitivan učinak na specijaciju bakra u uzorcima⁽³²⁾.

4.1.3. Eliminacija interferencija

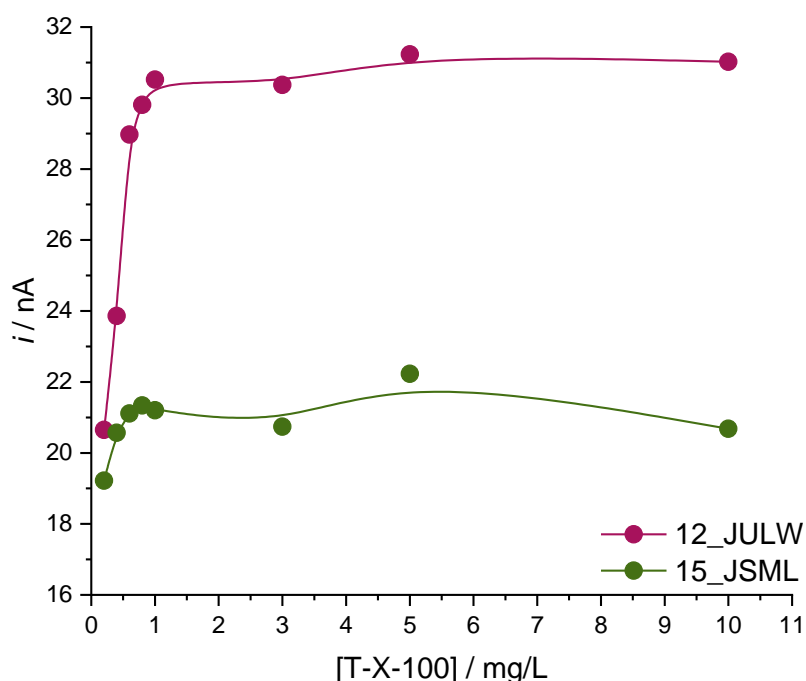
Kod prirodnih uzoraka smetnje prilikom mjerenja najčešće nastaju zbog adsorpcije PAT na površini radne elektrode. Taj proces ometa korak redukcije slobodnog i labilno vezanog Cu²⁺ i/ili korak njegove reoksidacije u ASV, što konačno rezultira nižom osjetljivošću tehnike ili nepravilnim izgledom voltametrijskog pika. O sastavu uzorka i vrsti PAT-a ovisi u kojoj će se mjeri PAT adsorbirati na površinu radne elektrode. Kao konačnu posljedicu adsorpcije PAT dobivamo neprecizne parametre specijacije bakra. S obzirom na to da PAT mogu činiti značajan udio otopljene organske tvari u morskoj vodi⁽³³⁾, analiza takvih uzoraka zahtjeva primjenu određenog negativnog potencijala desorpcije i dodatak T-X-100 da bi utjecaj PAT prirodno prisutne u uzorcima na elektrokemijske procese bakra bio minimalan⁽³²⁾.

4.1.3.1. Dodatak T-X-100

Kod uzoraka s visokim sadržajem otopljene organske tvari moguće je smanjiti interferencije u vidu smanjivanja njihove adsorpcije na radnu elektrodu dodatkom modelne površinski aktivne tvari. Adsorbirani sloj prirodne organske tvari koja ima svojstva površinske aktivnosti utječe na redoks procese na granici faza elektroda-otopina. U slučaju redukcije metalnog iona iz otopine u živinu radnu elektrodu, adsorbirani sloj organske tvari blokira prijenos Cu²⁺ iona do elektrode, inhibira kemijsku reakciju prije ili nakon prijenosa elektrona te usporava prijenos elektrona⁽³²⁾.

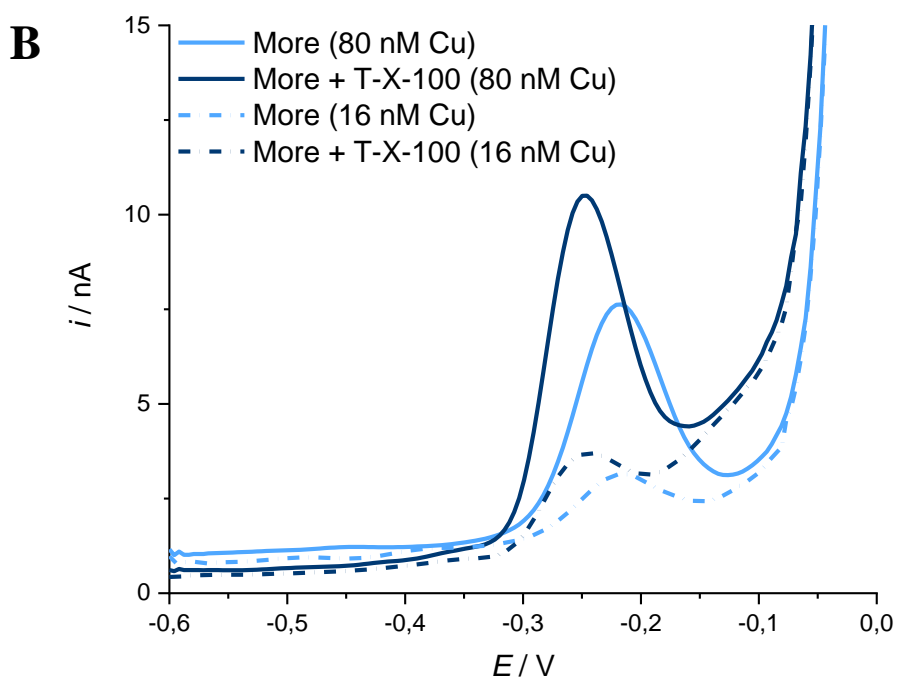
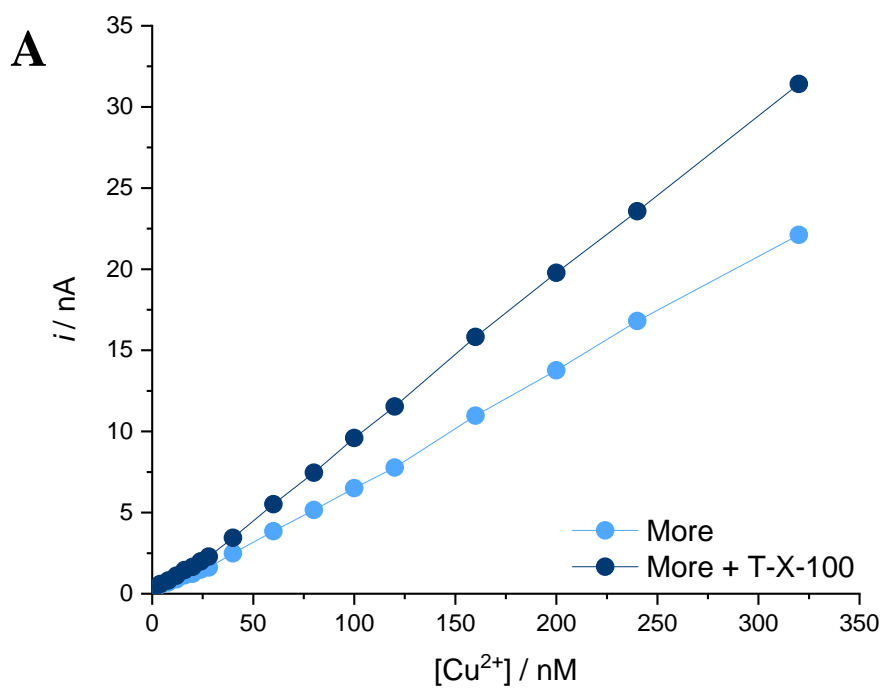
Hidrofobne PAT se maksimalno adsorbiraju na živinoj elektrodi na potencijalu od oko $-0,6$ V kod kojeg površina živine kapi ne nosi naboj⁽³¹⁾. T-X-100 je neionski deterdžent koji se široko koristi kao modelna površinski aktivna tvar za kvantificiranje PAT u prirodnim vodenim uzorcima⁽³³⁾.

Slika 14 prikazuje ovisnost anodne vršne struje bakra, $[Cu^{2+}] = 560$ nM o koncentraciji T-X-100.



Slika 14. Ovisnost anodne vršne struje bakra o koncentraciji T-X-100 za uzorke površinskog mikrosloja mora i potpovršinske vode, $[Cu^{2+}] = 560$ nM, vrijeme dušiciranja 120 s, $E_a = -0,6$ V, $t_a = 60$ s, $E_d = -1,4$ V.

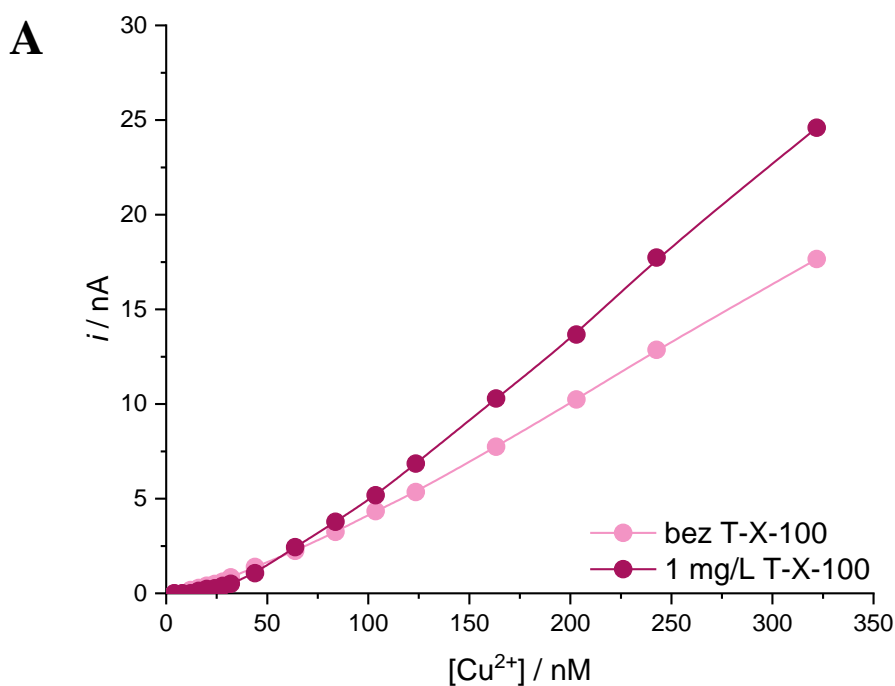
Iznos vršne struje bakra u oba uzorka povećava se u rasponu koncentracija T-X-100 od 0,2 do 1 mg/L nakon čega postiže približno konstantnu vrijednost. Porast struje bakra u prisustvu T-X-100 događa se najvjerojatnije kao posljedica elektrokemijskih procesa bakra uslijed promjene u mehanizmu kemijske reakcije, ako uzmemo u obzir Cu^+ u ukupnom procesu reoksidacije bakra iz amalgama⁽³¹⁾. Na Slici 15 je prikazana titracijska krivulja Cu^{2+} u elektrolitu morske vode sa i bez dodatka T-X-100.

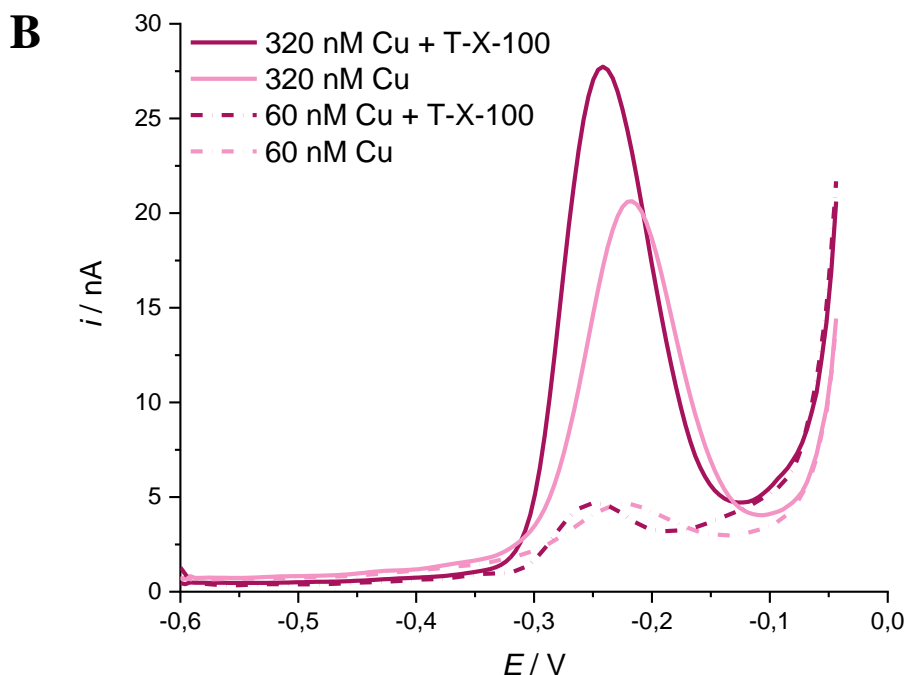


Slika 15. A) Titracijska krivulja Cu^{2+} u elektrolitu morske vode sa i bez 1 mg/L T-X-100, B) DPASV voltamogrami sa i bez T-X-100 za $[\text{Cu}^{2+}] = 16$ i 80 nM, vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1,4$ V.

Vidljivo je da na početku titracijskih krivulja nema zakrivljenog dijela karakterističnog za uzorke u kojima su prisutni inertni organski ligandi. To ukazuje da uslijed dodatka T-X-100 u elektrolit morske vode nije došlo do kompleksiranja bakra te je prisutan linearan odnos koji prati porast koncentracije bakra jer u elektrolitu nema organske tvari (oksidirana je tijekom UV izlaganja). Negativan pomak kao i uži te definirani anodni pik oksidacije bakra može se objasniti destabilizacijom inače stabilnog $[\text{CuCl}_2]^-$ zbog adsorbiranog sloja T-X-100 tijekom anodne promjene potencijala⁽³¹⁾⁽³²⁾.

Nadalje, ispitan je utjecaj dodatka 1 mg/L T-X-100 u uzorke SML i ULW na vršnu struju bakra. Na Slici 16 prikazana je titracijska krivulja bakra u uzorku potpovršinske vode (12_JULW) sa i bez dodatka 1 mg/L T-X-100 te pripadajući voltamogrami bakra pri $[\text{Cu}^{2+}] = 60$ i 320 nM.





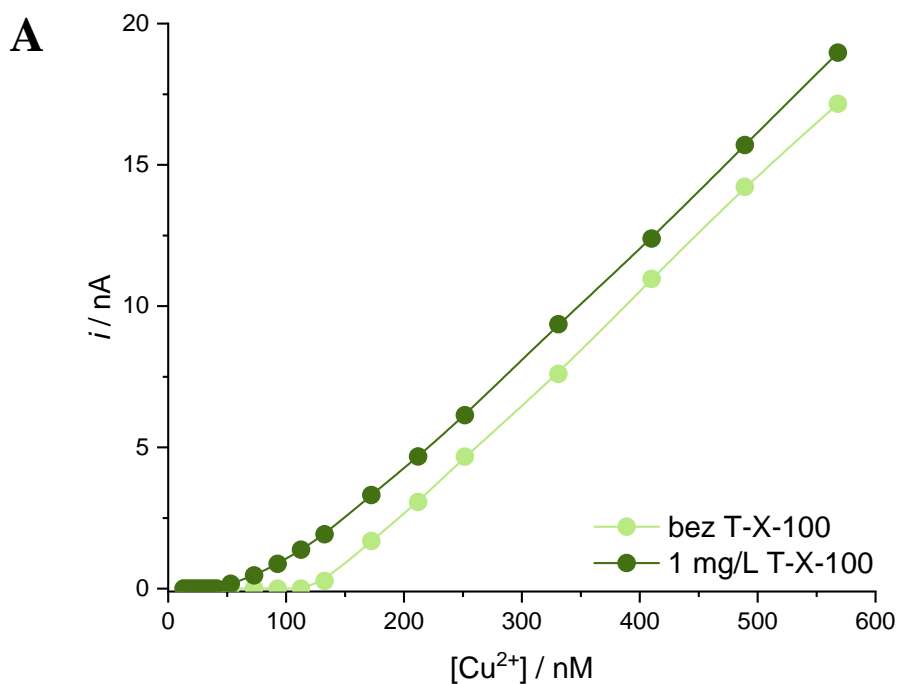
Slika 16. A) Titracijska krivulja bakra u uzorku potpovršinske vode (12_JULW) sa i bez dodatka površinski aktivne tvari, $[T-X-100] = 1 \text{ mg/L}$, vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6 \text{ V}$, $t_a = 120 \text{ s}$, $E_d = -1,4 \text{ V}$, B) DPASV voltamogrami bakra za $[Cu^{2+}] = 60$ i 320 nM , bez i sa dodatkom 1 mg/L T-X-100 .

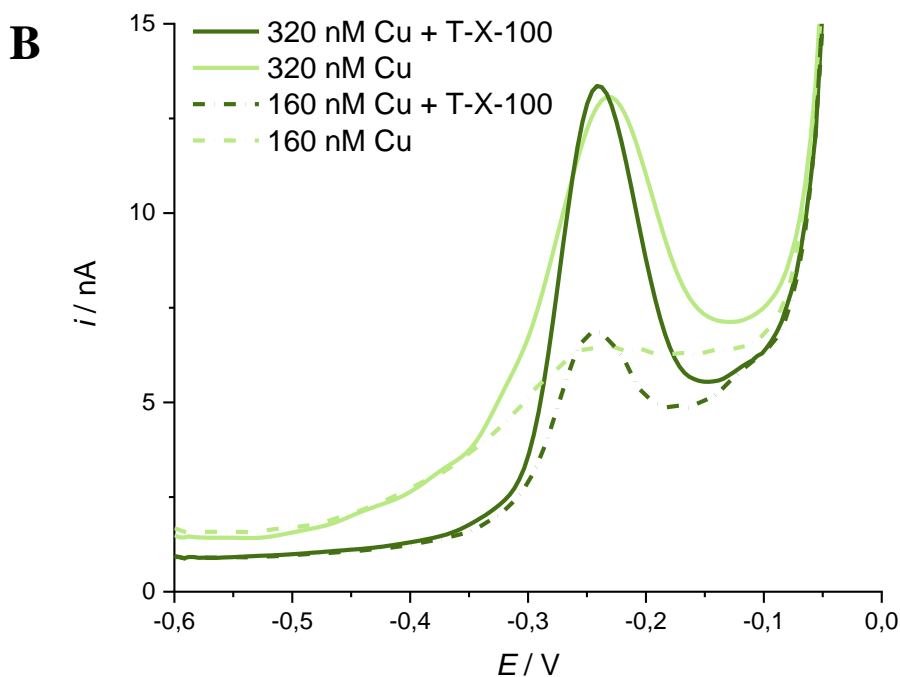
Porast struje bakra u prisustvu T-X-100 u uzorku potpovršinske vode ovisan je o koncentraciji dodanih Cu^{2+} iona. Mjerenje je izvršeno u rasponu koncentracija Cu^{2+} iona od $4 - 320 \text{ nM}$, a najveći utjecaj na vršnu struju vidljiv je kod viših koncentracija bakra, što potvrđuje pozitivan učinak na oksidaciju bakra. Nakon dodatka T-X-100 pik bakra postaje simetričniji i viši, te je istodobno pomaknut prema negativnijim vrijednostima potencijala što označava olakšanu oksidaciju. Sve navedene razlike uzrokovane adsorbiranjem T-X-100 na površinu živine elektrode tijekom elektrokemijskih reakcija bakra.

Na Slici 17 prikazana je titracijska krivulja bakra u uzorku mikrosloja mora (15_JSML) bez i sa dodatkom 1 mg/L T-X-100 te pripadajući voltamogrami bakra pri $[Cu^{2+}] = 160$ i 320 nM . Mjerenje je izvršeno u rasponu koncentracija Cu^{2+} iona od $4 - 560 \text{ nM}$ pri potencijalu akumulacije od $-0,6 \text{ V}$, uz vrijeme dušiciranja od 300 s te korakom desorpcije na $-1,4 \text{ V}$ u trajanju od 1 s.

Porast struje bakra u uzorku mikrosloja vidljiv je prilikom svakog dodatka Cu^{2+} iona. Pozitivan utjecaj T-X-100 na prirodu pika bakra vidljiv je i u navedenom uzorku mikrosloja.

U uzorku bogatom otopljenom organskom tvari nije došlo do znatnijeg povećanja iznosa vršne struje, no jasno se vidi poboljšanje u izgledu anodnog pika koji je s dodatkom T-X-100 znatno uži i pomaknut prema negativnijim potencijalima.



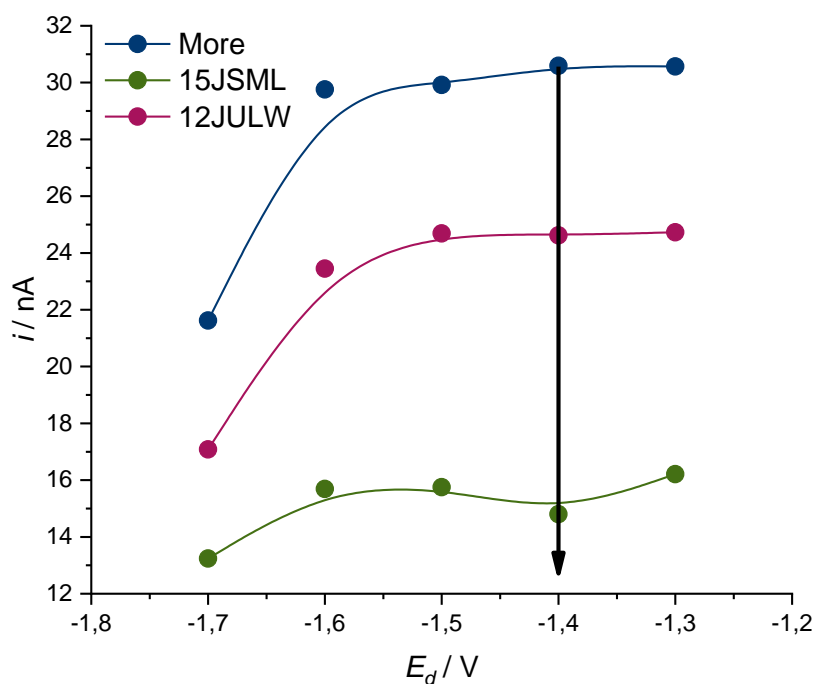


Slika 17. A) Titracijska krivulja bakra u uzorku mikrosloja mora (15_JSML) s i bez dodatka T-X-100, $[\text{T-X-100}] = 1 \text{ mg/L}$, vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6 \text{ V}$, $t_a = 120 \text{ s}$, $E_d = -1,4 \text{ V}$.

B) DPASV voltamogrami bakra za $[\text{Cu}^{2+}] = 160$ i 320 nM , s i bez dodatka T-X-100.

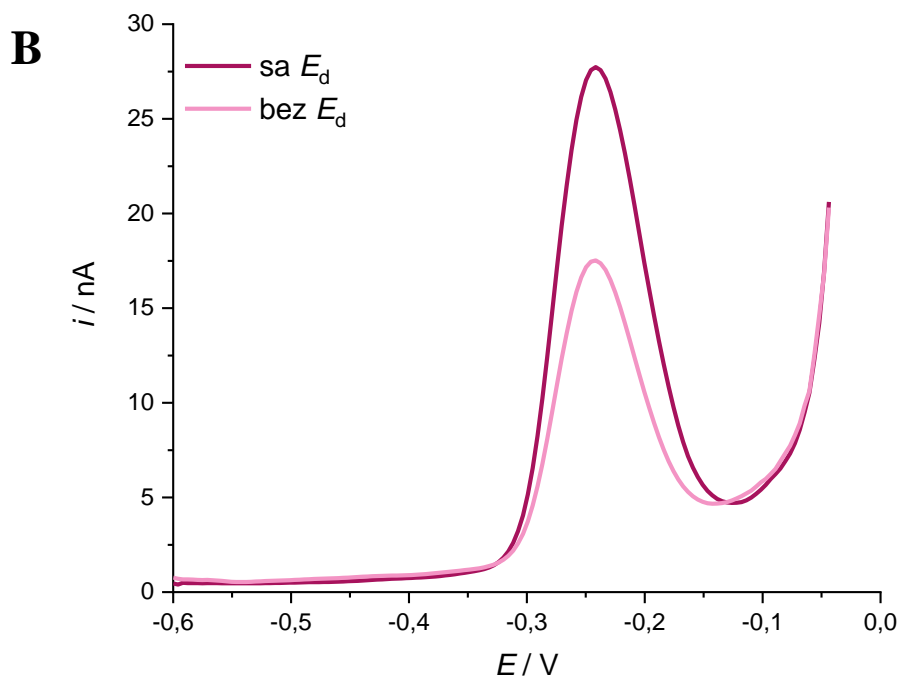
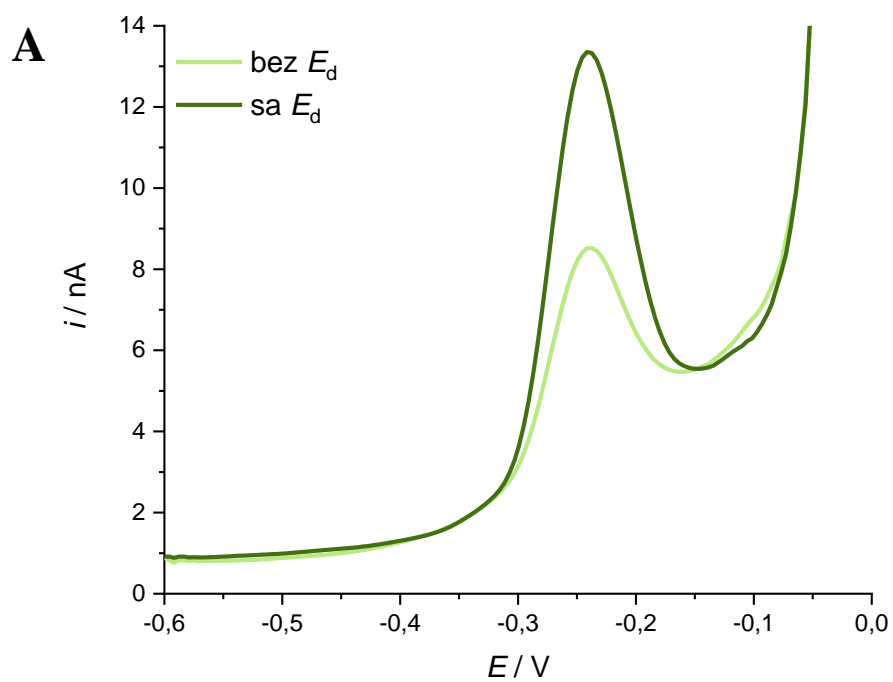
4.1.3.2. Potencijal desorpcije

Pri potencijalima negativnijim od $-1,3 \text{ V}$ dolazi do desorpcije PAT s površine elektrode. Stoga se za uklanjanje PAT kao interferencija tijekom mjerenja na kraju koraka akumulacije primjenjuje tzv. korak desorpcije na vrlo negativnoj vrijednosti potencijala ($E_d < -1,3 \text{ V}$) u vrlo kratkom trajanju ($1 - 3 \text{ s}$). Korak desorpcije u velikoj mjeri smanjuje učinke interferencija PAT i omogućuje bolji odziv elektrode te stvaranje dobro definiranog pika bakra⁽³²⁾. Na Slici 18 je prikazana ovisnost anodne vršne struje bakra o potencijalu desorpcije (E_d) pri koncentraciji Cu^{2+} od 560 nM .



Slika 18. Ovisnost anodne vršne struje bakra o potencijalu desorpcije za elektrolit morske vode te uzorke mikrosloja i potpovršinske vode, $[Cu^{2+}] = 560 \text{ nM}$, vrijeme dušiciranja 120 s, $E_a = -0,6 \text{ V}$, $t_a = 60 \text{ s}$.

Kod sva tri uzorka opaža se da promjena E_d od -1,3 V do -1,6 V nema utjecaj na vršnu struju bakra, dok se na E_d -1,7 V struja smanjila. Treba navesti i da potencijal prilikom koraka desorpcije ne bi trebao biti negativniji od -1,8 V kako se ne bi izašlo iz radnog prozora Hg elektrode zbog razvoja vodika na vrlo negativnim potencijalima. Najviše vrijednosti vršnih struja zabilježene su u elektrolitu morske vode iz kojeg je uklonjena otopljenom organska tvar, dok su najniže vršne struje bakra zabilježene kod uzorka mikrosloja (15_JSML) bogatog otopljenom organskom tvari. Na temelju ovog eksperimenta odabran je potencijal desorpcije od -1,4 V u trajanju od 1 s za sva buduća mjerenja. Na Slici 19 A i B dan je prikaz voltamograma bakra snimljenog u uzorku mikrosloja mora i potpovršinske vode.

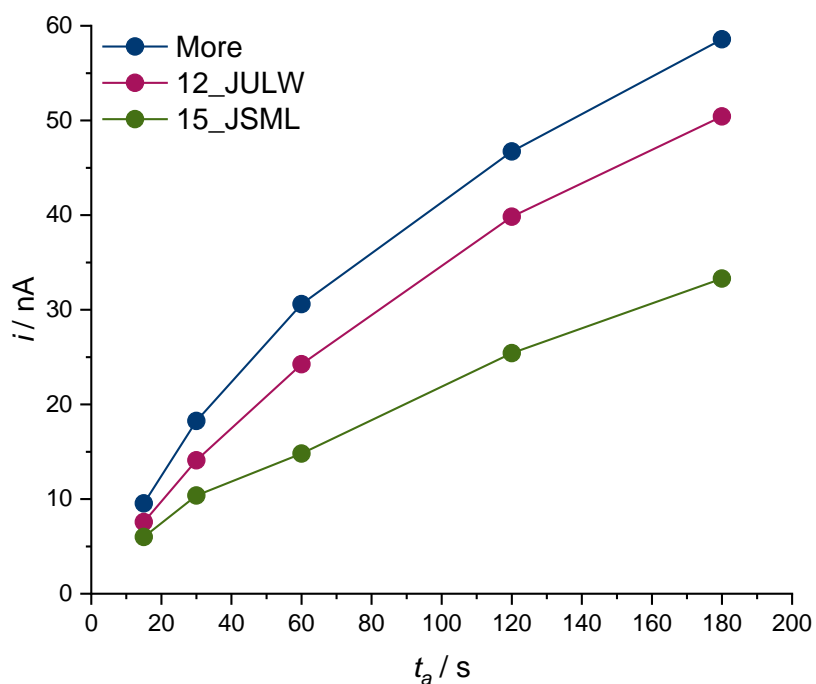


Slika 19. DPASV voltamogrami bakra u uzorku A) površinskog mikrosloja mora (15_JSML) s dodanih 400 nM Cu^{2+} i B) potpovršinske vode (12_JULW) s dodanih 320 nM Cu^{2+} , dobiveni sa i bez koraka desorpcije na $E_d = -1,4 \text{ V}$ u trajanju od 1 s, $[\text{T-X-100}] = 1 \text{ mg/L}$.

Voltamogrami s nižim pikom odgovaraju mjerenju bez korištenja koraka desorpcije, dok su viši pikovi dobiveni uz $E_d = -1,4$ V tijekom 1 s na kraju koraka akumulacije. Iznos vršne struje pika uz korak desorpcije za uzorak SML iznosi $i = 10,96$ nA, dok je iznos vršne struje pika bez koraka desorpcije $i = 4,59$ nA, što znači da se struja pika uz primjenu E_d povisila 2,4 puta, što ide u prilog povećanju osjetljivosti. Iznos vršne struje kod ULW uzorka uz korak desorpcije iznosi $i = 25,04$ nA, dok je iznos struje bez koraka desorpcije $i = 14,64$ nA, što je 1,7 puta manja vrijednost. Iako korak desorpcije nije imao utjecaj na izgled pika, došlo je do znatnog povećanja iznosa vršne struje primjenom istog⁽¹⁷⁾.

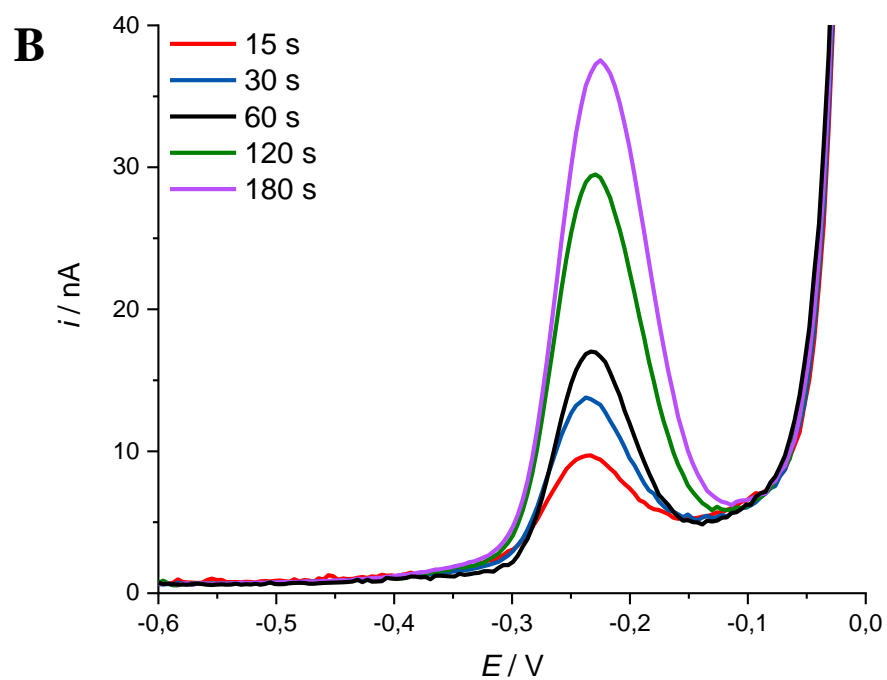
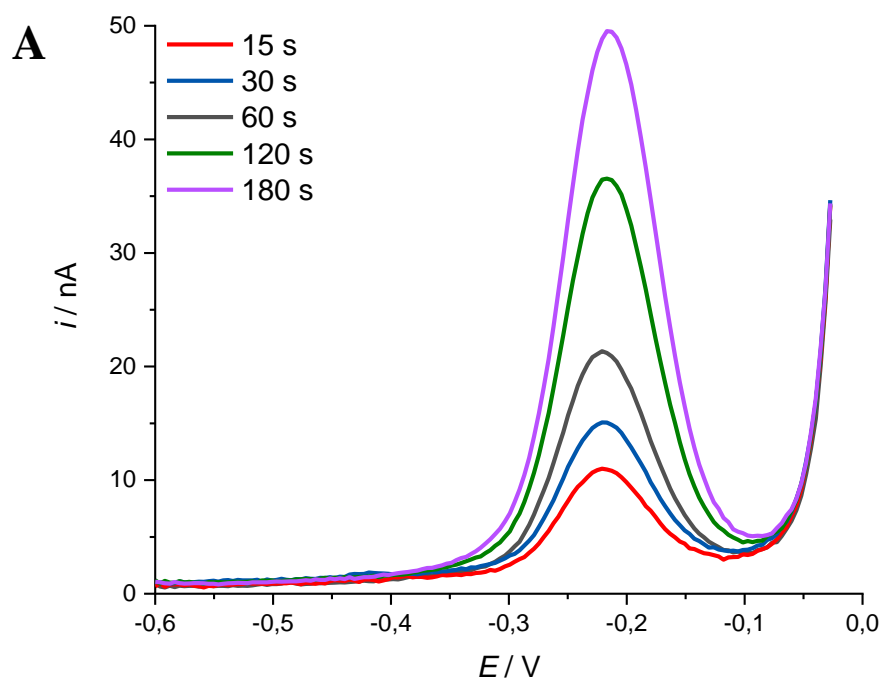
4.1.4. Vrijeme akumulacije

Metalni ion Cu^{2+} se za vrijeme akumulacije na određenom potencijalu reducira pri čemu se otapa u živi stvarajući amalgam. Prilikom određivanja parametara CuCC obično se koristi vrijeme akumulacije od 60 do 300 s. Vrijeme akumulacije kraće od 60 s onemogućava određivanje labilnih kemijskih vrsta kod vrlo niskih prisutnih koncentracija bakra⁽³⁴⁾. Zbog važnosti odabira vremena akumulacije i sa pogleda osjetljivosti DPASV metode ispitana je ovisnost vršne struje bakra o vremenu akumulacije od 15 do 180 s u elektrolitu morske vode, uzorku mikrosloja mora (15_JSML) i potpovršinske vode (12_JULW) (Slika 20).



Slika 20. Ovisnost anodne vršne struje bakra o vremenu akumulacije za uzorke mikrosloja mora (15_JSML), potpovršinske vode (12_JULW), te elektrolit morske vode, $[Cu^{2+}] = 560$ nM, vrijeme dušiciranja 120 s, $E_a = -0,6$ V, $E_d = -1,4$ V.

Kod sva tri uzorka opaža se porast vršne struje bakra s dužim vremenom akumulacije koji ne slijedi linearnu ovisnost. Najviše vrijednosti vršnih struja zabilježene su kod elektrolita morske vode (uklonjena otopljena organska tvar), dok su najniže vršne struje bakra zabilježene kod uzorka mikrosloja mora (15_JSML) bogatog otopljenom organskom tvari i visokom koncentracijom organskih liganada (Tablica 1 i Tablica 3).



Slika 21. DPASV voltamogrami pri različitim vremenima akumulacije za uzorak A) potpovršinske vode (12_JULW), i B) mikrosloja mora (15_JSML), vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6$ V, $E_d = -1,4$ V, [T-X-100] = 1 mg/L.

Najviše vrijednosti struja su za ULW uzorak zabilježene pri 180 s akumulacije ($i = 50,43$ nA), dok su najniže vrijednosti zabilježene pri 15 s akumulacije ($i = 7,58$ nA). Najviše vrijednosti struja za SML uzorak zabilježene su također pri 180 s akumulacije ($i = 33,29$ nA), dok su najniže vrijednosti zabilježene pri 15 s ($i = 6,13$ nA) akumulacije. Odabrano vrijeme akumulacije za daljnja titracijska DPASV mjerenja nakon provedenog eksperimenta iznosi 120 s.

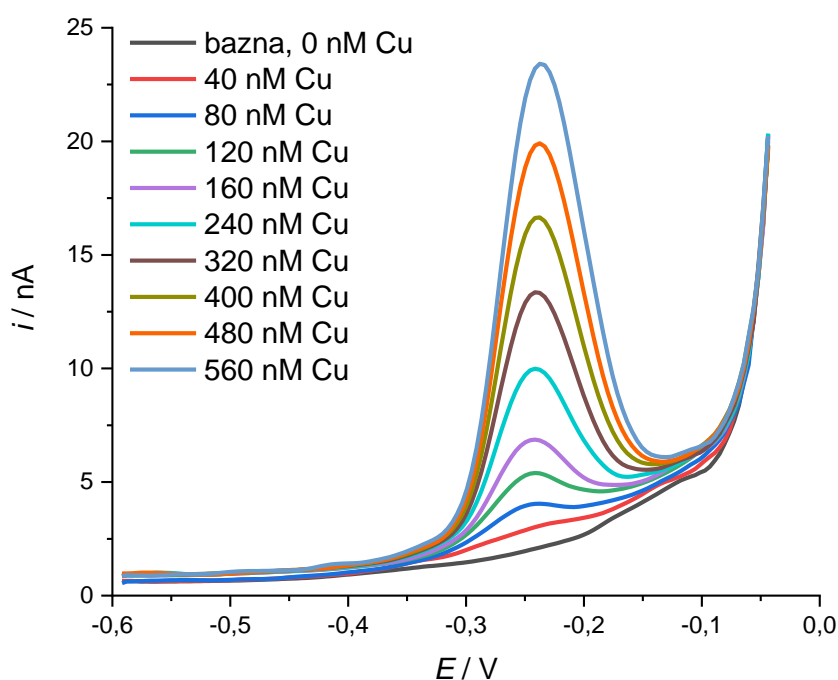
Na temelju dobivenih pseudopolarograma te mjerenja pri različitim potencijalima desorpcije, vremenima akumulacije i koncentraciji T-X-100, definirani su eksperimentalni uvjeti u kojima će se mjeriti titracijske krivulje bakra u svim uzorcima:

- Potencijal akumulacije (E_a) = -0,6 V
- Potencijal desorpcije (E_d) = -1,4 V
- Vrijeme akumulacije (t_a) = 120 s
- Koncentracija T-X-100 = 1 mg/L

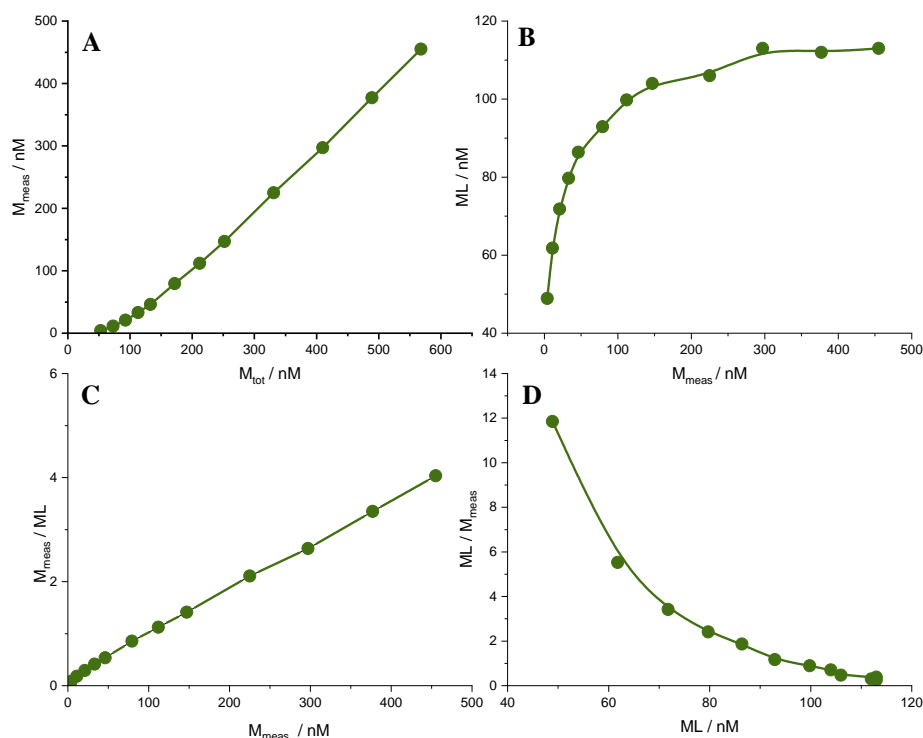
Iako je kod oba analizirana uzorka prisutno značajno poboljšanje u izgledu pika bakra kao posljedica dodatka T-X-100, primijenjen je i korak desorpcije u trajanju od 1 s koji uzrokuje još višu struju pika bakra u konačnim voltamogramima⁽³²⁾.

4.2. Promjena parametara CuCC tijekom razdoblja veljača – srpanj 2019.

Svrha određivanja parametara CuCC je procjena sposobnosti uzorka da kompleksira s bakrom pri njegovoj povećanoj koncentraciji. Parametre CuCC pod koje ubrajamo broj razreda organskih liganada L_i , njihovu koncentraciju i odgovarajuće prividne konstante stabilnosti kompleksa odredili smo za uzorke mikrosloja (SML) te uzorke potpovršinske vode (ULW) uzorkovane u razdoblju od veljače do srpnja 2019. godine. Na Slici 22 su prikazani DPASV voltamogrami za uzorak mikrosloja mora (15_JSML) mjereni pri različitim koncentracijama standardne otopine Cu^{2+} , a na Slici 23 titracijska krivulja i matematičke transformacije napravljene u PromMCC programu. Smatra se da jedna, dvije ili čak tri klase liganada koji tvore komplekse bakar – ligand u omjeru 1:1 pouzdano prikazuju titracijsku krivulju, odnosno kompleksiranje bakra s organskim ligandima.



Slika 22. DPASV voltamogrami oksidacije bakra za uzorak mikrosloja mora (15_JSML), vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6$ V, $E_d = -1,4$ V, $t_a = 120$ s, $[\text{T-X-100}] = 1$ mg/L.



Slika 23. A) izvorna titracijska krivulja uzorka mikrosloja mora 15_JSML te pripadajuće matematičke transformacije prema B) Langmuir/Gerringa, C) Ružić-van den Berg i D) Scatchard modelu dobivene u PromCC programu.

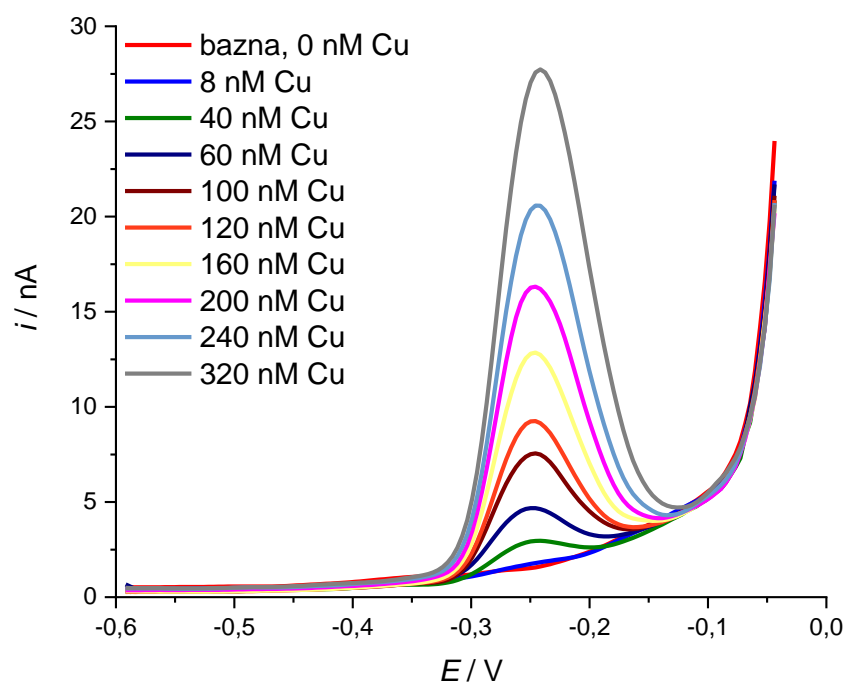
Mjerenje struje oksidacije bakra u ovisnosti o dodanoj koncentraciji standardne otopine Cu^{2+} napravljeno je u rasponu koncentracija od 4 – 560 nM. Porast struje bakra u uzorku mikrosloja mora ovisan je o koncentraciji dodanih Cu^{2+} iona te o kapacitetu prisutnih organskih liganada za vezanje dodanog Cu^{2+} u inertne komplekse. Dodatkom Cu^{2+} koncentracija manjih od 40 nM nije detektiran pik bakra (Slike 22 i 23) jer se sav dodani Cu^{2+} tijekom uravnoteženja (5 minuta uvođenja dušika nakon svakog dodatka Cu^{2+}) vezao u inertne elektroinaktivne komplekse. Povećanjem koncentracije Cu^{2+} do oko 160 nM dolazi do zasićenja organskih liganada za vezanje Cu^{2+} nakon čega slijedi linearna ovisnost vrha titracijske krivulje koji označava tzv. nekompleksirajući dio. Iako se u teoriji linearni raspon asimptotski približava nekompleksirajućem odnosu, često se koristi za prikaz osjetljivosti metode odnosno za transformiranje intenziteta signala u izmjerene koncentracije potrebne za daljne izračune.

Do eventualnih poteškoća može doći ukoliko je u otopini prisutan i npr. treći, najslabiji organski ligand (L_3) koji zasićenje postiže upravo u linearnom dijelu dobivene titracijske krivulje⁽²¹⁾.

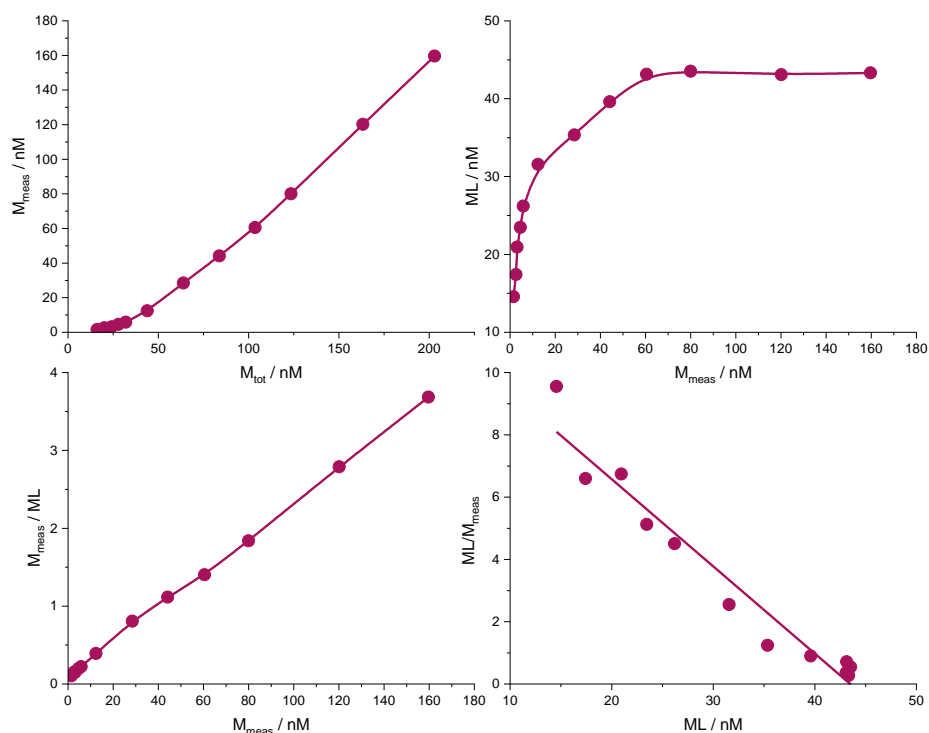
Nakon titracijske krivulje slijedi korak izračuna parametara CuCC, odnosno izračun ukupne koncentracije liganada te uvjetne konstante stabilnosti prilagođavanjem eksperimentalnih podataka odgovarajućem modelu. Matematička transformacija prema Langmuir/Gerringa modelu koja je odabrana za određivanje parametara CuCC u uzorcima srednjeg Jadrana daje nelinearnu ovisnost labilnog [ML] i nađenog odnosno mjenenog metala [M_{meas}]. Mjerena koncentracija Cu^{2+} dobiva se pomoću izmjerenih intenziteta podijeljenim s faktorom osjetljivosti (S). Ružić/van den Berg model prikazuje linearnu ovisnost [M_{meas}]/[ML] o [M_{meas}]. Matematička transformacija prema Scatchard modelu prikazuje ovisnost [ML]/[M_{meas}] o [ML]. Prema izgledu krivulje napravljene prema Scatchard modelu procijenili smo broj prisutnih liganada na način da je linearna ovisnost ukazivala na prisutnost jednog tipa liganada, a nelinearna konveksna ovisnost na prisutnost dva tipa liganada⁽²¹⁾⁽³⁵⁾.

U uzorku mikrosloja mora 15_JSML prisutna je koncentracija organskih liganada koji kompleksiraju bakar veća od prirodno prisutne koncentracije ukupnog bakra (13,20 nM) jer se tek dodatkom 60 nM Cu^{2+} počelo izlaziti iz područja kapaciteta (Slika 23 A - titracijska krivulja). Matematička transformacija prema Scatchard modelu nije slijedila linearnu ovisnost te zaključujemo da su u uzorku mikrosloja mora (15_JSML) bila prisutna dva tipa liganada (L_1 i L_2).

Na Slici 24 su prikazani voltamogrami za uzorak potpovršinske vode (12_JULW) za različite koncentracije bakra, a na Slici 25 pripadajuća titracijska krivulja i matematičke transformacije dobivene u ProMCC programu. Mjerenje je izvršeno u rasponu koncentracija od 4 – 320 nM Cu^{2+} iona. Za uzorak 12_JULW, prema prikazanoj titracijskoj krivulji, koncentracija organskih liganada koji kompleksiraju bakar također je veća od prirodno prisutne koncentracije bakra (4,10 nM) jer se dodatkom > 16 nM Cu^{2+} počelo izlaziti iz područja kapaciteta. Niža dodana koncentracija Cu^{2+} vezala se u jake inertne organske komplekse koji se ne reduciraju pri odabranom potencijalu akumulacije. Matematička transformacija prema Scatchard modelu slijedi linearnu ovisnost te zaključujemo da je u uzorku potpovršinske vode prisutan jedan tip liganada (L_1).



Slika 24. DPASV voltamogrami bakra za uzorak potpovršinske vode (12_JULW), vrijeme dušiciranja = 300 s, $E_a = -0,6$ V, $E_d = -1,4$ V, $t_a = 120$ s, [T-X-100] = 1 mg/L.



Slika 25. A) izvorna titracijska krivulja uzorka mikrosloja mora 12_JULW te pripadajuće matematičke transformacije prema B) Langmuir/Gerringa, C) Ružić-van den Berg i D) Scatchard modelu dobivene u ProMCC programu.

U Tablici 1 dan je prikaz analiziranih 12 uzoraka mikrosloja mora s postaje Jadrija (J_SML) te 4 uzorka s postaje Martinska (M_SML) uzorkovanih u razdoblju od veljače do srpnja 2019. godine.

Tablica 2 prikazuje rezultate analize 12 uzoraka potpovršinske vode s postaje Jadrija (J_ULW) te 3 uzorka s postaje Martinska (M_ULW) uzorkovanih u razdoblju od veljače do srpnja 2019. godine.

Za sve uzorke su prikazane vrijednosti saliniteta (S), temperature ($T/^\circ\text{C}$), koncentracija otopljenog organskog ugljika (DOC) te koncentracija ukupnog otopljenog bakra $[\text{Cu}]_{\text{tot}}$ s vrijednostima pogreške.

Tablica 1. Datum uzorkovanja, oznaka uzorka, salinitet, temperatura mora, otopljeni organski ugljik, koncentracija otopljenog bakra s pripadajućim vrijednostima pogreške u uzorcima površinskog mikrosloja mora.

Datum	Oznaka uzorka	S	T / °C	DOC / mg/L	Cu_{tot} / nM	±
07. 02.	1_JSML	38,60	12,82	0,985	20,12	0,84
20. 02.	5_JSML	29,30	12,40	0,793	2,98	0,14
06. 03.	7_JSML	37,94	12,62	1,521	22,52	0,78
21. 03.	9_JSML	38,38	13,59	0,877	5,14	0,30
02. 04.	11_JSML	37,79	14,38	6,762	11,53	0,49
17. 04.	15_JSML	36,48	14,67	1,16	13,20	1,19
30. 04.	17_JSML	37,92	16,22	1,026	3,82	0,22
16. 05	19_JSML	38,42	16,12	1,002	3,27	0,35
29. 05	21_JSML	36,88	19,23	0,420	2,38	0,42
13. 06.	25_JSML	31,31	22,93	0,670	4,84	0,17
27. 06.	27_JSML	36,89	23,88	0,920	12,09	1,12
09. 07.	29_JSML	34,79	25,41	0,205	7,83	0,88
07. 02.	3_MSML	5,53	9,44	0,807	4,52	0,21
02. 04.	13_MSML	14,88	13,22	7,250	7,34	0,64
29. 05.	23_MSML	9,12	19,96	0,445	6,79	0,36
09. 07.	31_MSML	21,25	26,16	0,345	9,07	0,82

Tablica 2. Datum uzorkovanja, oznaka uzorka, salinitet, temperatura mora, otopljeni organski ugljik, koncentracija ukupnog otopljenog bakra s pripadajućim vrijednostima pogreške u uzorcima potpovršinske vode.

Datum	Oznaka uzorka	S	T / °C	DOC / mg/L	Cu_{tot} / nM	±
07. 02.	2_JULW	36,20	13,20	0,821	2,92	0,13
20. 02.	6_JULW	36,20	13,25	0,809	2,85	0,32
06. 03.	8_JULW	38,15	12,88	0,790	2,88	0,21
21. 03.	10_JULW	38,38	13,58	0,847	4,75	0,14
02. 04.	12_JULW	37,96	14,41	0,971	4,10	0,15
17. 04.	16_JULW	36,94	14,74	0,965	3,97	0,28
30. 04.	18_JULW	37,92	16,23	0,969	2,62	0,18
16. 05.	20_JULW	38,45	16,08	0,972	2,15	0,19
29. 05.	22_JULW	37,14	18,55	0,900	2,73	0,10
13. 06.	26_JULW	33,88	23,01	0,940	4,06	0,21
27. 06.	28_JULW	37,22	23,46	0,835	3,57	0,23
09. 07.	30_JULW	34,75	25,41	0,895	6,57	0,47
02. 04.	14_MULW	22,60	14,38	0,837	5,63	0,28
29. 05.	24_MULW	11,16	19,79	0,921	3,21	0,14
09. 07.	32_MULW	22,53	26,29	0,945	5,44	0,33

U Tablici 3 prikazane su vrijednosti koncentracija za dvije klase liganada (L_1 i L_2) prisutne u uzorcima mikrosloja mora, kao i ukupna koncentracija prisutnih liganada ($L_1 + L_2$) i odgovarajuće prividne konstante stabilnosti kompleksa. Za uzorak mikrosloja mora (15_JSML) koji smo prethodno analizirali ukupna koncentracija prisutnih liganada koja ujedno predstavlja i kapacitet kompleksiranja iznosi 119,60 nM. Od ukupno 16 analiziranih uzoraka mikrosloja mora, u četiri uzorka su bile prisutne dvije klase liganada, od kojih su tri uzorka mikrosloja mora s postaje Jadrija (06. 03., 17. 04., 27. 06.) te jedan uzorak s postaje Martinska (02. 04.). Koncentracije liganada klase L_1 u rasponu su od 40,50 – 76,1 nM, dok su koncentracije klase L_2 u rasponu od 28,4 - 392 nM.

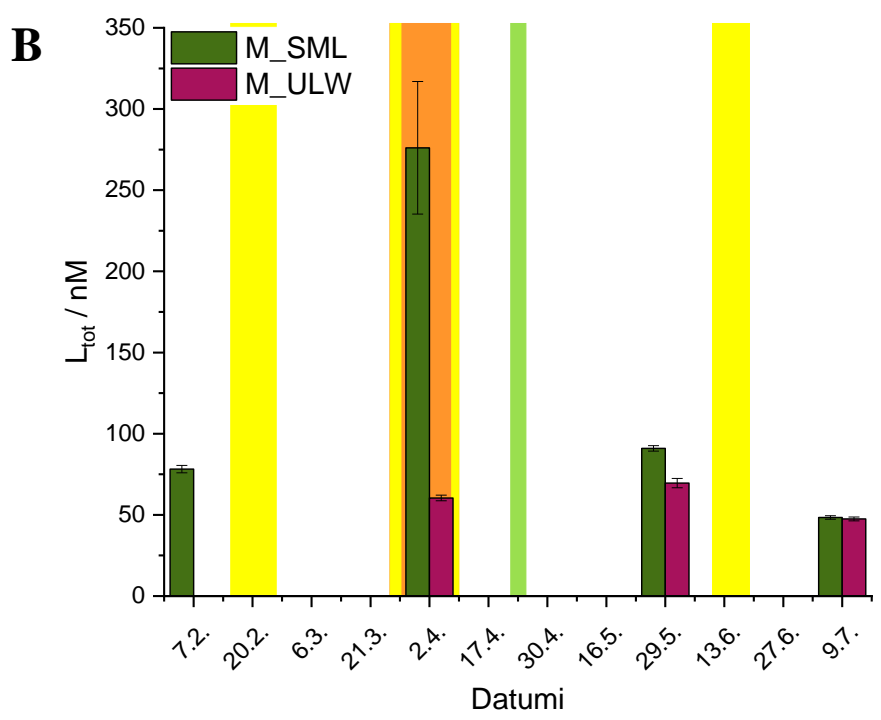
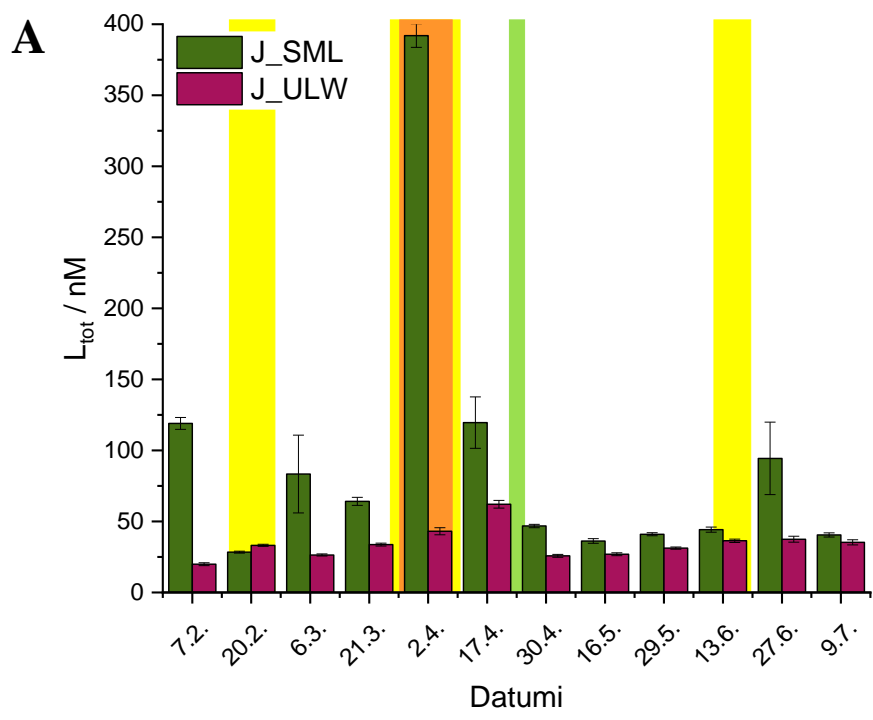
U uzorcima potpovršinske vode bila je prisutna samo jedna klasa liganada (L_2). U Tablici 4 prikazane su vrijednosti koncentracija za L_2 klasu liganada prisutnu u uzorcima potpovršinske vode (ULW) kao i odgovarajuće prividne konstante stabilnosti kompleksa te vrijednosti koncentracije slobodnog Cu^{2+} . Za uzorak potpovršinske vode (12_JULW) koji smo prethodno analizirali ukupna koncentracija prisutnih liganada koja ujedno predstavlja i kapacitet kompleksiranja iznosi 43,1 nM. Navedeni podatak označava koncentraciju organskih liganada koja je sposobna vezati bakar u inertne komplekse, odnosno koncentraciju nakon koje će se pojaviti labilan/slobodan bakar.

Tablica 3. Koncentracije za L₁ i L₂ klasu liganada, ukupna koncentracija liganada (L_{tot} = L₁ + L₂), prividne konstante stabilnosti kompleksa i koncentracija slobodnog bakra u uzorcima mikrosloja mora.

Datum	Uzorak	[L ₁]/ nM	±	[L ₂]/ nM	±	[L _{tot}]/ nM	±	logK ₁	±	logK ₂	±	[Cu _{slob}]/ pM
07. 02.	1_JSML			119,0	4,15	119,00	4,15			9,62	0,12	46,14
20. 02.	5_JSML			28,4	0,72	28,40	0,72			9,69	0,03	16,70
06. 03.	7_JSML	40,50	14,60	42,9	12,80	83,40	27,40	11,11	2,76	8,89	0,32	9,25
21. 03.	9_JSML			64,1	2,84	64,10	2,84			9,30	0,07	36,90
02. 04.	11_JSML			392,0	8,34	392,00	8,34			9,11	0,07	22,60
17. 04.	15_JSML	52,80	9,90	66,8	8,20	119,60	18,10	10,34	0,35	8,64	0,15	14,20
30. 04.	17_JSML			46,8	1,21	46,80	1,21			9,48	0,05	25,20
16. 05	19_JSML			36,2	1,64	36,20	1,64			9,54	0,07	24,10
29. 05	21_JSML			41,0	1,08	41,00	1,08			9,58	0,04	14,20
13. 06.	25_JSML			44,2	1,82	44,20	1,82			9,72	0,07	21,20
27. 06.	27_JSML	45,00	14,50	49,4	11,00	94,40	25,50	10,41	0,39	8,84	0,35	13,20
09. 07.	29_JSML			40,5	1,49	40,50	1,49			10,02	0,09	21,40
07. 02.	3_MSML			78,2	2,29	78,20	2,29			9,53	0,08	16,70
02. 04.	13_MSML	76,10	22,50	200,0	18,30	276,10	40,80	10,65	1,62	8,32	0,18	2,34
29. 05.	23_MSML			91,0	1,69	91,00	1,69			9,60	0,05	19,00
09. 07.	31_MSML			48,4	1,07	48,40	1,07			9,75	0,05	36,90

Tablica 4. Koncentracije za L₂ klasu liganda, prividne konstante stabilnosti kompleksa i koncentracija slobodnog bakra u uzorcima potpovršinske vode.

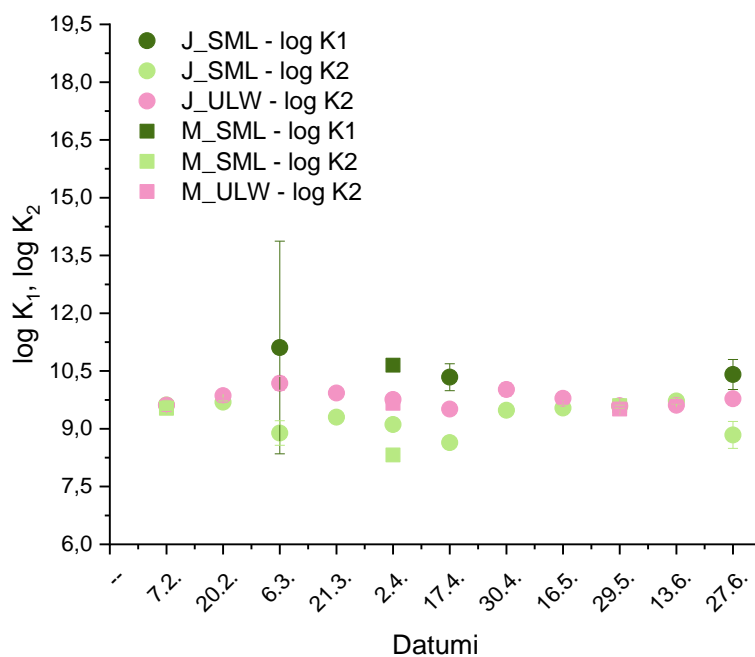
Datum	Uzorak	[L ₂]/ nM	±	logK ₂	±	[Cu _{slob}] / pM
07. 02.	2_JULW	19,9	1,04	9,61	0,16	31,80
20. 02.	6_JULW	33,2	0,70	9,86	0,06	11,80
06. 03.	8_JULW	26,4	0,74	10,18	0,18	7,61
21. 03.	10_JULW	33,7	1,02	9,93	0,06	17,60
02. 04.	12_JULW	43,1	2,53	9,76	0,07	16,60
17. 04.	16_JULW	62,1	2,68	9,51	0,10	18,97
30. 04.	18_JULW	25,8	1,06	10,02	0,17	9,89
16. 05	20_JULW	26,9	1,02	9,79	0,08	12,30
29. 05	22_JULW	31,2	0,82	9,60	0,04	20,20
13. 06.	26_JULW	36,4	1,18	9,61	0,05	26,40
27. 06.	28_JULW	37,5	2,12	9,78	0,08	15,70
09. 07.	30_JULW	35,3	1,85	10,03	0,11	19,80
02. 04.	14_MULW	60,4	1,75	9,66	0,05	20,70
29. 05.	24_MULW	69,6	2,88	9,51	0,10	9,28
09. 07.	32_MULW	47,5	1,19	9,80	0,04	18,90



Slika 26. Kapaciteti kompleksiranja za uzorke mikrosloja i potpovršinske vode za postaje A) Jadrija i B) Martinska s označenim razdobljima specifične atmosfere depozicije: žuto-požar, narančasto-pelud, zeleno-Saharska prašina.

Na Slici 26 su prikazane razlike u iznosu kapaciteta kompleksiranja za uzorke mikrosloja mora i potpovršinske vode s postaja Jadrija (A) i Martinska (B). Žutom bojom označena su razdoblja emisije otvorenog požara, narančastom datumima kad su prilikom uzorkovanja zabilježene velike količine peludi, a zelenom je bojom označen period donosa Saharske prašine. Za postaju Jadrija najveće razlike u kapacitetima zabilježene su kod uzoraka 11_JSML i 12_JULW uzorkovanih 02. 04. Uzorak 11_JSML ujedno ima najveći iznos kapaciteta kompleksiranja (392 nM). Slijede uzorci 15_JSML (17. 04.), 1_JSML (07. 02.) te 27_JSML (27. 06.). Kod uzoraka potpovršinske vode, najveći kapaciteti kompleksiranja zabilježeni su za uzorke 16_JULW (17. 04.) i 12_JULW (02. 04.). Kod uzoraka mikrosloja mora s postaje Martinska najveći kapacitet kompleksiranja (276,10 nM) ima uzorak 13_MSML uzorkovan 02. 04., a od analiziranih uzoraka potpovršinske vode najveću vrijednost (69,6 nM) ima uzorak 24_MULW (29. 05). Za uzorke mikrosloja mora detektirane su klase liganada [L₁] od 40,50 – 76,1 nM i [L₂] od 28,4 – 392 nM, dok je za uzorke potpovršinske vode određena samo klasa L₂ liganada, [L₂] od 19,9 – 69,6 nM.

Slika 27 prikazuje prividne konstante stabilnosti kompleksa za uzorke s postaja Jadrija i Martinska.



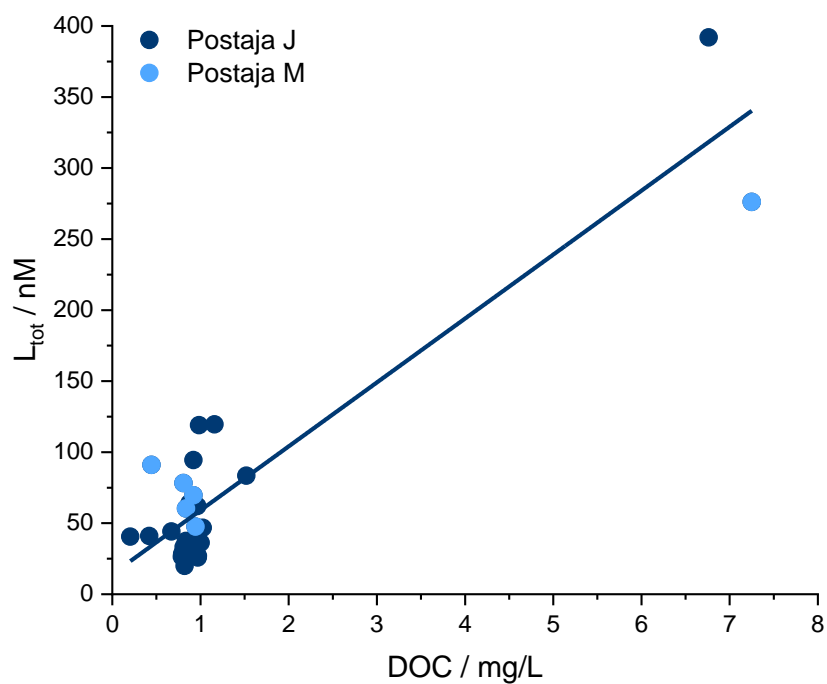
Slika 27. Prividne konstante stabilnosti kompleksa za uzorke s postaje Jadrija i Martinska.

Za uzorke mikrosloja mora vrijednosti $\log K_1$ iznose od 10,34 – 11,1, a vrijednosti $\log K_2$ iznose od 8,32 – 10,02. Vrijednosti $\log K_2$ za uzorke potpovršinske vode u rasponu su od 9,51 do 10,18. Prosječna vrijednost uvjetnih konstanti stabilnosti za uzorke mikrosloja iznosi 10,63 za $\log K_{CuL1}$ i 9,35 za $\log K_{CuL2}$, a za uzorke potpovršinske vode, $\log K_{CuL2}$ je 9,78.

4.3. Količina liganada po masi otopljenog organskog ugljika

U uzorcima mikrosloja mora i potpovršinske vode povećanjem ukupne koncentracije otopljenog organskog ugljika raste i koncentracija organskih liganada koji vežu bakar (Slika 28). Najveće vrijednosti otopljenog organskog ugljika i organskih liganada određene su u SML uzorcima mikrosloja mora uzorkovanog 02. 04. 2019. na postaji Jadrija ($DOC = 6,76 \text{ mg L}^{-1}$, $L_{tot} = 392 \text{ nM}$) i Martinska ($DOC = 7,25 \text{ mgL}^{-1}$, $[L_{tot}] = 276,1 \text{ nM}$). Najviše koncentracije DOC u potpovršinskoj vodi izmjerene su u uzorku 20_JULW ($DOC = 0,972 \text{ mgL}^{-1}$), dok su najviše koncentracije liganada bile u uzorku 24_MULW ($[L_{tot}] = 69,6 \text{ nM}$).

Korelacija L_{tot} i DOC je za SML i ULW uzorke statistički značajna ($p < 0,05$), pozitivna i ukazuje na odličnu povezanost ta dva parametra ($r = 0,90$).



Slika 28. Promjena koncentracije organskih liganada u odnosu na ukupnu koncentraciju otopljenog organskog ugljika (DOC) u površinskom mikrosloju mora (SML) i potpovršinskoj vodi (ULW).

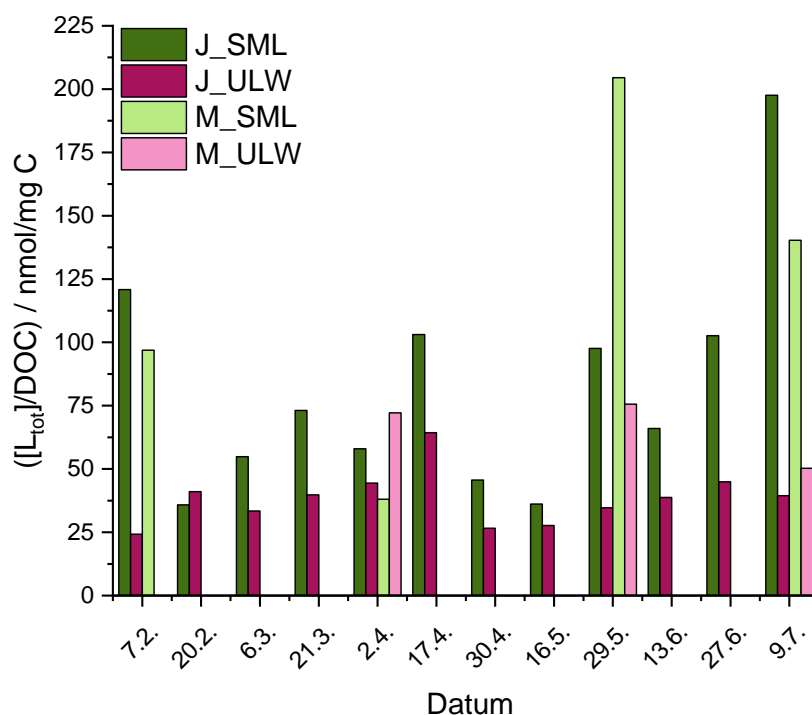
Normalizacijom koncentracije L_{tot} prema vrijednostima DOC izračunata je količina organskih liganada po masi organskog ugljika u otopljenoj frakciji pojedinog uzorka, $[L_{tot}]/DOC$ (nmol/mg) (Tablica 5). Vrijednosti koncentracija za otopljeni organski ugljik (DOC) navedene su u Tablicama 1 i 2.

Tablica 5. Normalizacija koncentracije L_{tot} prema vrijednostima DOC-a.

Datum i postaja	SML	ULW
	[L_{tot}]/DOC nmol/mg C	[L_{tot}]/DOC nmol/mg C
07. 02. J	120,81	24,24
20. 02. J	35,81	41,04
06. 03. J	54,83	33,42
21. 03. J	73,09	39,79
02. 04. J	57,97	44,39
17. 04. J	103,10	64,35
30. 04. J	45,61	26,63
16. 05. J	36,13	27,67
29. 05. J	97,62	34,67
13. 06. J	65,97	38,72
27. 06. J	102,61	44,91
09. 07. J	197,56	39,44
07. 02. M	96,90	/
02. 04. M	38,08	72,16
29. 05. M	204,49	75,57
09. 07. M	140,29	50,26

C – ugljik, / - nije mjereno

Količina liganada po masi otopljenog organskog ugljika za uzorke mikrosloja mora je u rasponu od 35,81 – 204,49 nmol/mg C, a u prosjeku iznosi 91,91 nmol/mg C, dok vrijednosti za potpovršinsku vodu variraju između 24,24 – 75,57 nmol/mg C, a u prosjeku iznose 43,82 nmol/mg C. Najveća količina liganada po masi organskog ugljika zabilježena je 29. 05. 2019. na postaji Martinska u uzorku mikrosloja mora (204,49 nmol/mg C) i u uzorku potpovršinske vode (75,57 nmol/mg C). Najmanja količina liganada po masi organskog ugljika dobivena je za postaju Jadrija u uzorku mikrosloja mora uzorkovanog 20. 02. 2019. (35,81 nmol/mg C) te u uzorku potpovršinske vode uzorkovane 07. 02. 2019. (24,24 nmol/mg C).



Slika 29. Promjena količine organskih liganada po masi organskog ugljika u uzorcima srednjeg Jadrana tijekom perioda veljača-srpanj 2019. godine.

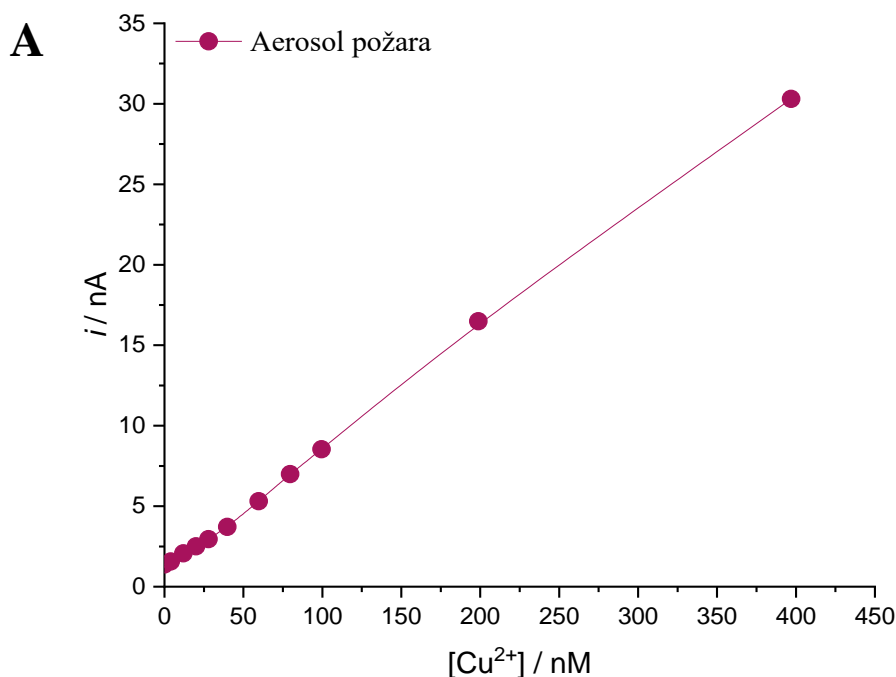
4.4. Modeli specifičnog atmosferskog taloženja

U morskoj vodi topljiva frakcija aerosola umjetnog požara i otopina proteina BSA bile su model specifičnog atmosferskog taloženja radi potvrde utjecaja istih na parametre CuCC u analiziranim uzorcima srednjeg Jadrana.

4.3.1. Aerosol požara

U krugu ~ 30 km od mjesta uzorkovanja na postajama Jadrija i Martinska u periodu veljača – srpanj 2019. zabilježeni su otvoreni požari, odnosno gorenje poljoprivrednog otpada i borove šume (16. 02. – 21. 02. 2019. godine, 31. 03. – 03. 04. 2019. godine) te niskog bilja i maslina (06. 05. – 14. 06. 2019. godine). Zbog procjene utjecaja atmosferske depozicije aerosola požara na parametre CuCC u uzorcima SML i ULW, određeni su parametri CuCC u elektrolitu morske vode u kojem je otopljen filter sa sakupljenim aerosolom umjetnog požara. U titracijskoj krivulji nije uočeno zakrivljenje koje bi upućivalo na kapacitet kompleksiranja bakra (Slika 30).

Ovaj rezultat nam je potvrdio da je utjecaj požara u vidu atmosferskog unosa organskih liganada u more na parametre CuCC tijekom perioda uzorkovanja bio minimalan ili gotovo nikakav.

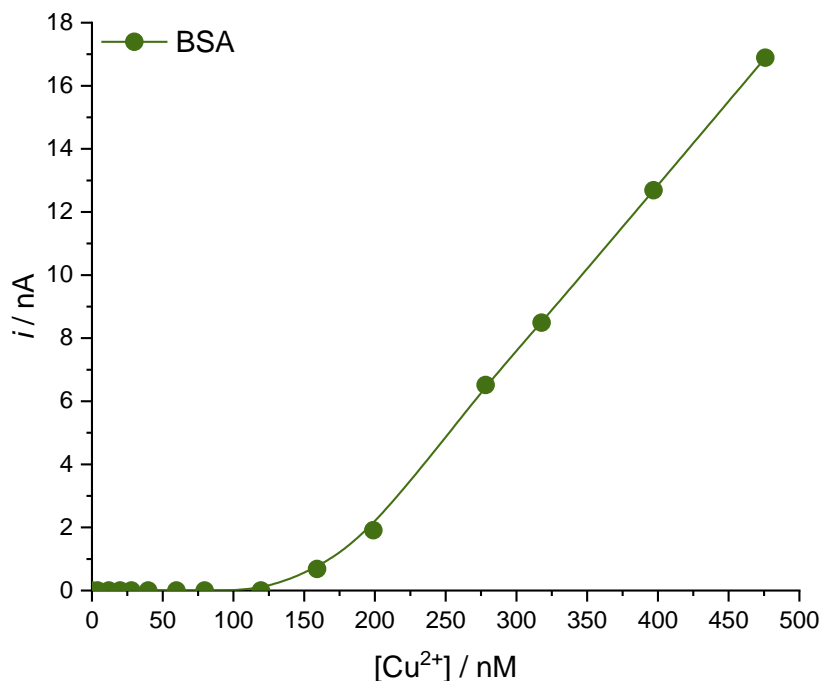


Slika 30. Titracijska krivulja ovinosti vršne struje o koncentraciji bakra, [T-X-100] = 1 mg/L, vrijeme dušiciranja 300 s, $E_a = -0,6$ V, $t_a = 120$ s, $E_d = -1,4$ V.

4.3.2. BSA kao model za proteine u peludu

BSA je standardni protein često korišten u analitičkim metodama kao model za proteine. Tijekom travnja 2019. godine zabilježene su velike količine peludi na površini mora obje postaje što je u analizama organske tvari uzrokovalo izrazito visoku koncentraciju čestičnog (engl. *particulate organic carbon*, POC) i otopljenog (engl. *dissolved organic carbon*, DOC) organskog ugljika, a time i visoku koncentraciju otopljenih organskih liganada (Tablica 3 i 4). Pošto je pelud različitih biljaka vrlo bogata organskim spojevima poput proteina (do 60 %) ⁽³⁶⁾⁽³⁷⁾ koji bi mogli doprinijeti kapacitetu kompleksiranja bakra, određeni su parametri CuCC za otopinu BSA u elektrolitu morske vode koji su bili usporedivi s koncentracijama liganada L₂ te logK_{CuL₂} određenih za SML uzorke.

Na Slici 31 prikazana je titracijska krivulja ovisnosti vršne struje bakra o potencijalu za pripremljenu modelnu otopinu BSA, $[BSA] = 1 \text{ mg/L}$.



Slika 31. Titracijska krivulja ovisnosti vršne struje o potencijalu za modelnu otopinu BSA, $[BSA] = 1 \text{ mg/L}$, $[T-X-100] = 1 \text{ mg/L}$, $E_a = -0,6 \text{ V}$, $t_a = 120 \text{ s}$, $E_d = -1,4 \text{ V}$.

Tablica 6. Koncentracija BSA, koncentracija L₂ klase liganada i pripadajuća konstanta stabilnosti.

$[BSA] / \text{mg/L}$	$[L_2] / \text{nM}$	\pm	$\log K$	\pm
1	152	3,07	9,29	0,56

Iz dobivenih rezultata zaključujemo da i otopljeni proteini porijeklom iz peluda unesenom atmosferskim taloženjem u površinski mikrosloj mora najvjerojatnije doprinose kapacitetu kompleksiranja bakra u uzorcima SML iz travnja 2019. godine.

4.5. Faktori obogaćenja za organske ligande i DOC

Obogaćivanje tvari u površinskom mikrosloju mora u odnosu na potpovršinski sloj označava utjecaj atmosferskog taloženja odnosno specifičnih atmosferskih događaja kao što su donosi aerosola požara i saharske prašine te utjecaj intenzivnih oborina i vjetra. Ako razmatramo utjecaj atmosferske depozicije na biološke parametre unutar površinskih slojeva mora, važno je navesti kako je SML pod utjecajem donosa hranjivih tvari iz atmosfere, dok je ULW opskrbljen hranjivim tvarima čije su koncentracije slične onima koje se nalaze unutar vodenog stupca. Za SML pretpostavljamo da je kao gornji milimetar površine mora bogatiji organskim materijalom od potpovršinske vode. Izračunom faktora obogaćenja (engl. *enrichment factor*, EF) dobivamo omjer određene kemijske komponente (x) u mikrosloju mora i potpovršinskoj vodi, te ukoliko je $EF > 1$ potvrdit ćemo prethodno navedenu pretpostavku.

Za svaki je par uzoraka SML-ULW određen faktor obogaćenja u površinskom mikrosloju mora za:

1) L_{tot}

$$EF = \frac{L_{tot}(SML)}{L_{tot}(ULW)} \quad (14)$$

gdje L_{tot} (SML) označava koncentraciju ukupnih bakrovih liganada u mikrosloju, a L_{tot} (ULW) koncentraciju liganada u potpovršinskoj vodi, i

2) DOC

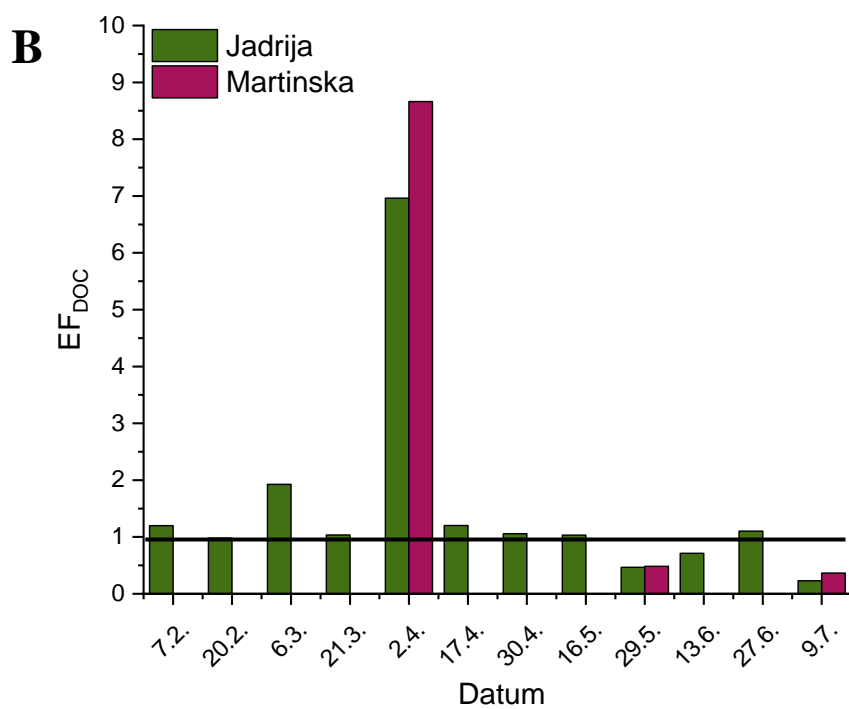
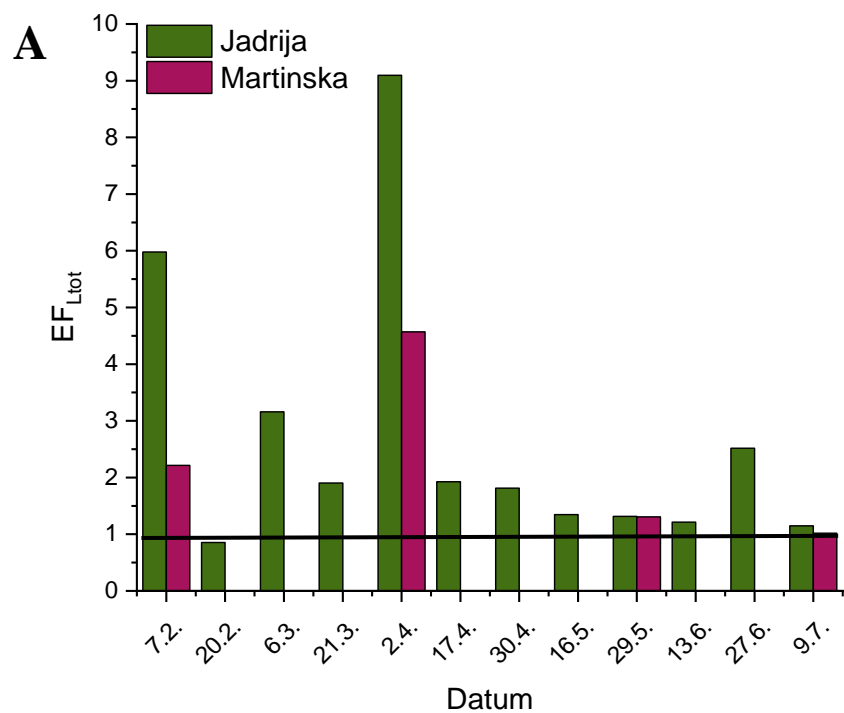
$$EF = \frac{DOC(SML)}{DOC(ULW)} \quad (15)$$

gdje DOC označava količinu otopljenog organskog ugljika u mikrosloju (SML), odnosno u potpovršinskoj vodi (ULW). Za uzorke kod kojih je zabilježena veća količina peludi (travanj 2019. godine) zabilježene su i puno više vrijednosti za DOC.

Na Slici 32 su prikazane dobivene vrijednosti faktora obogaćenja za L_{tot} i DOC za uzorke s postaje Jadrija i Martinska.

Faktor obogaćenja Cu liganada, $EF_{L_{tot}}$ u površinskom mikrosloju mora varira između 0,9 i 9,1 s proječnom vrijednosti od 2,58. Vrijednosti EF_{DOC} variraju između 0,2 i 8,7 sa prosječnom vrijednosti od 1,83.

Osim u uzorku 20. 02. na postaji Jadrija, SML je tijekom veljače - srpanj 2019. godine na postajama Jadrija i Martinska bio obogaćen Cu organskim ligandima ($EF > 1$). U 15 od 16 analiziranih uzoraka faktor obogaćenja liganada ima vrijednost > 1 što ukazuje na veću količinu prisutnog organskog materijala u površinskom mikrosloju mora u odnosu na potpovršinsku vodu. Kako površinski mikrosloj mora predstavlja gornji milimetar površine mora, odnosno granicu faza atmosfera – more, zaključujemo da organski materijal prisutan u SML ne potječe iz vodenog stupca, već iz atmosferskog donosa. Značajno obogaćenje organskim materijalom ($EF > 2$) zabilježeno je kod ukupno šest od 16 analiziranih uzoraka. Posebno se ističu uzorci 02. 04. s EF 9,1 za Jadriju i EF 4,6 za Martinsku u kojima su dobivene i najviše vrijednosti $[L_{tot}]$ kao i iznadprosječne vrijednosti DOC-a za oligotrofno more. Razlog navedenih visokih koncentracija je atmosferski donos i otapanje velike količine peludi zabilježene u SML tijekom travnja 2019. godine. U kemijskom sastavu peludi prevladavaju organski spojevi poput proteina čiji udio je između 2,5 - 61 % ⁽³⁷⁾, a dobro je poznato da peptidi i aminokiseline stvaraju komplekse s bakrom u morskoj vodi⁽³⁸⁾.

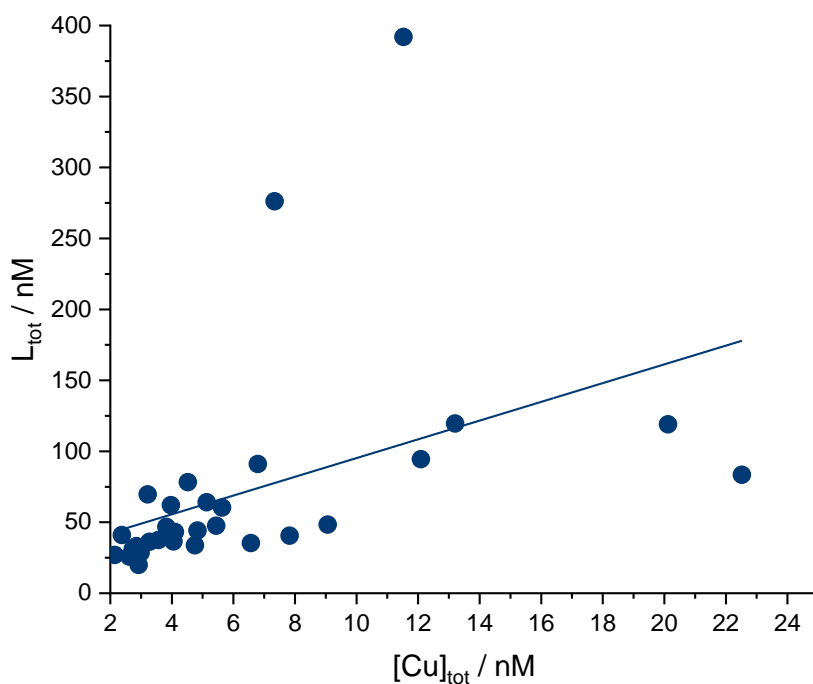


Slika 32. Faktor obogaćenja (EF) za A) L_{tot} i B) DOC za postaje Jadrije i Martinska u razdoblju veljača – srpanj 2019. godine. Crnom crtom označen je $EF = 1$.

Što se tiče faktora obogaćenja za DOC (EF_{DOC}), u 10 od 15 analiziranih uzoraka faktor obogaćenja je veći od 1 što dokazuje veću količinu otopljenog organskog ugljika u mikrosloju mora u odnosu na potpovršinsku vodu. Kod uzoraka kod kojih je $EF < 1$ (Slika 32) ne postoji obogaćivanje DOC-om u SML-u već je veća koncentracija organskog ugljika u ULW posljedica biokemijskih procesa u samom vodenom stupcu koji nije direktno izložen atmosferskom donosu.

4.6. Povezanost koncentracije organskih liganada i ukupne koncentracije bakra

Slika 33 prikazuje ovisnost ukupne koncentracije liganada o koncentraciji ukupnog otopljenog bakra za uzorke mikrosloja mora i potpovršinske vode.



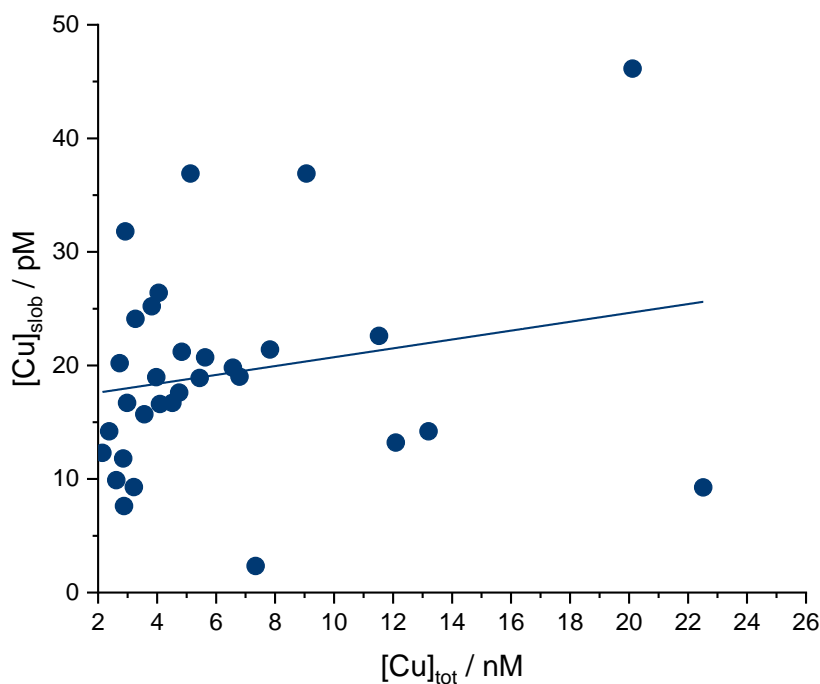
Slika 33. Ovisnost ukupne koncentracije liganada o koncentraciji ukupnog bakra u otopljenoj frakciji uzoraka mikrosloja mora i potpovršinske vode.

Iz prikaza je vidljivo da povećanjem koncentracije ukupnog bakra raste i koncentracija organskih liganada koji imaju ključnu ulogu u regulaciji optimalne biodostupne koncentracije bakra. Između navedena dva parametra dobivena je statistički značajna ($p < 0,05$) slaba pozitivna korelacija ($r = 0,427$).

Takva ovisnost koncentracije bakra i organskih liganada od posebne je važnosti u oligotrofnim područjima mora upravo zbog njihove povećane osjetljivosti na nagle promjene koncentracija bakra. Organski spojevi biološkog porijekla (izlučeni iz stanica fitoplanktona)⁽³⁸⁾ kao i atmosferskog porijekla⁽⁹⁾ kompleksiraju bakar u površinskim slojevima mora.

Slika 34 prikazuje ovisnost koncentracije slobodnog bakra o koncentraciji ukupnog bakra za otoplenu frakciju uzoraka mikrosloja i potpovršinske vode.

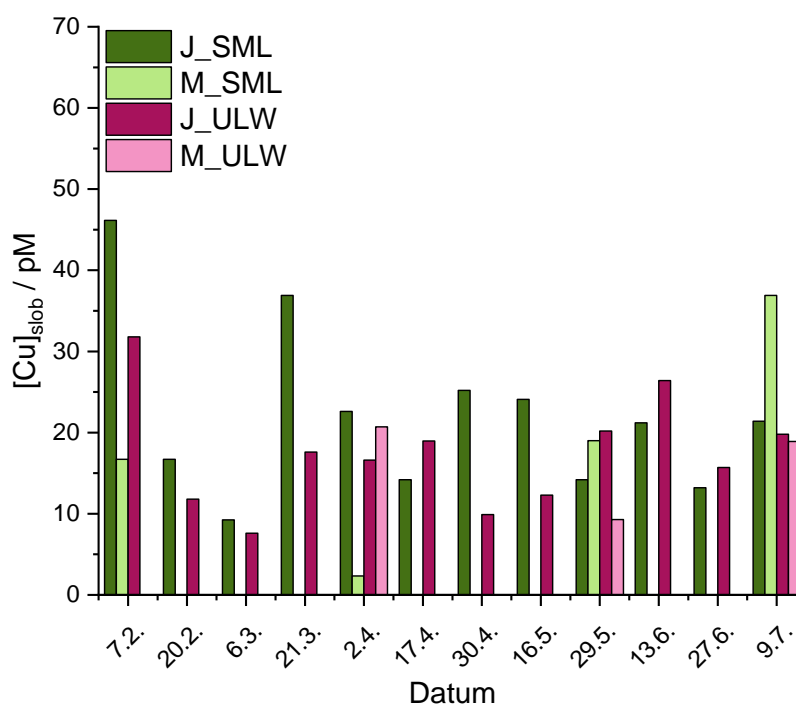
Zabilježen je pozitivan trend koji označava porast koncentracije slobodnog bakra s povećanjem koncentracije ukupnog bakra.



Slika 34. Ovisnost koncentracije slobodnog bakra o koncentraciji ukupnog bakra za otoplenu frakciju uzoraka mikrosloja i potpovršinske vode.

4.7. Procjena koncentracije slobodnog bakra

Jedan od glavnih ciljeva određivanja specijacije metala u prirodnim vodama je upravo procjena njihove biodostupnosti. Pokazalo se da koncentracije slobodnog bakra iznad 1-10 pM u prirodnom morskom okolišu štetno djeluju na neke vrste fitoplanktona⁽³⁹⁾⁽⁴⁰⁾⁽⁴¹⁾, dok je razina ispod 0,01 pM utvrđena kao biolimitirajuća za više različitih mikroorganizama^{[28][31][32]}.



Slika 35. Koncentracija slobodnog bakra u uzorcima mikrosloja mora i potpovršinske vode za postaje Jadrija i Martinska.

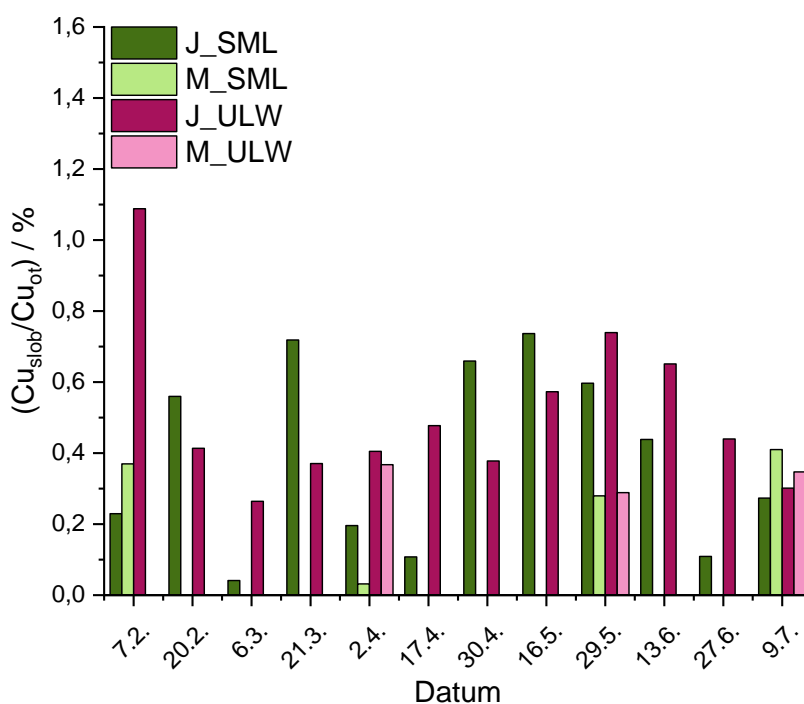
Slika 35 prikazuje procijenjenu koncentraciju slobodnog bakra u uzorcima mikrosloja mora i potpovršinske vode za postaje Jadrija i Martinska.

Navedene koncentracije dobivene su u programu ProMCC uz $\log \alpha = 20$, gdje je koeficijent sporednih anorganskih reakcija α („side reaction coefficient“) jednak omjeru zbroja koncentracija svih anorganskih vrsta bakra i koncentracije slobodnog bakra⁽²¹⁾⁽⁴⁴⁾.

Najveća koncentracija slobodnog, odnosno potencijalno biodostupnog bakra zabilježena je za uzorak mikrosloja mora s postaje Jadrija (07. 02.) te iznosi 46,14 pM.

Kod potpovršinske vode, najveća koncentracija zabilježena je za uzorak 2_JULW (07. 02.) te iznosi 31,80 pM. Najmanja koncentracija slobodnog bakra zabilježena je za uzorak 13_MSML (02. 04.) te iznosi 2,34 pM. Navedene vrijednosti su vrlo blizu procijenjene granice toksične koncentracije Cu od oko 10 pM. Udio slobodnog bakra u ukupnoj koncentraciji bakra za uzorke mikrosloja mora varira od 0,03 do 0,74 %, dok je za uzorke potpovršinske vode u rasponu od 0,26 – 1,09 % što je u skladu s otprije poznatom činjenicom da se <1 % ukupnog bakra u moru nalazi u slobodnom hidratiziranom obliku.

Na Slici 36 prikazan je omjer slobodnog i ukupnog bakra u otopljenoj frakciji analiziranih uzoraka za postaje Jadrija i Martinska u površinskom mikrosloju i potpovršinskoj vodi. Udio slobodnog bakra u ukupnoj koncentraciji bakra za uzorke potpovršinske vode najveći je za uzorak 2_JULW (07. 02., 1,09 %), dok najniža vrijednost dobivena za datum uzorkovanja 06. 03. (8_JULW, 0,26 %). Za uzorke mikrosloja mora najveći je udio prisutan u uzorku 19_JSML (16. 05., 0,74 %), dok je najniži udio zabilježen kod uzorka 13_MSML (02. 04., 0,03 %).



Slika 36. Omjer slobodnog i ukupnog bakra u otopljenoj frakciji analiziranih uzoraka za postaje Jadrija i Martinska u površinskom mikrosloju mora i potpovršinskoj vodi.

4.8. Usporedba parametara CuCC u površinskom sloju mora različitih dijelova Europe

Parametri CuCC dobiveni za površinski mikrosloj mora obalnog srednjeg Jadrana u ovom radu uspoređeni su s literaturno poznatim parametrima CuCC određenim u površinskom mikrosloju mora nekoliko područja u Europi: Norveških fjordova te područje SZ Sredozemlja⁽⁴⁵⁾⁽⁴⁶⁾ i Istočnog Sredozemlja⁽⁹⁾.

U svim navedenim radovima su parametri CuCC bili određeni u nefiltriranim uzorcima, vjerojatno zato jer je udio otopljenog organskog ugljika u ukupnom organskom ugljiku bio vrlo visok, dok je udio čestičnog organskog ugljika bio zanemariv. U ovom radu su parametri CuCC određeni u filtriranim uzorcima odnosno u otopljenoj frakciji ($<0,45 \mu\text{m}$) u kojoj se i nalaze sve kemijske vrste bakra. Najniže vrijednosti L_{tot} zabilježene su u oligotrofnom obalnom području srednjeg Jadrana, dok su najviše vrijednosti zabilježene u subartičkom području Norveških fjordova (Tablica 9). U svim navedenim područjima zabilježen je $EF > 1$ za L_{tot} što dovodi do zaključka kako je SML bogatiji organskom tvari od ULW-a.

Dobivene su identične vrijednosti $\log K$ za sva četiri navedena područja što upućuje na prisustvo sličnih organskih liganada koji kompleksiraju bakar, odnosno prisustvo liganada sa funkcionalnim grupama sličnog afiniteta za vezanje iona bakra u analiziranim područjima te sličnom L_2 klasom slabijih organskih liganada koji u najvećem dijelu doprinose regulaciji optimalne koncentracije bakra u moru⁽¹⁷⁾.

U područjima Sredozemlja i Jadrana dobivena je slična količina organskih liganada po jedinici mase otopljenog ugljika, dok je ona u Norveškim fjordovima bila i do 3 puta viša (Tablica 7).

Tablica 7. Usporedba dobivenih rezultata s rezultatima dobivenim u SML drugih područja Europe.

Područje	L_{tot} / nM	EF	logK	$([L_{tot}]/DOC) / \mu\text{mol}/\text{mg C}$
Norveški fjordovi ⁽⁴⁷⁾	230 - 1790	2,5	6,8 – 7,8	0,11 – 0,65
Obalno područje SZ Sredozemlja ⁽⁴⁶⁾	280 - 940	1,2	/	0,1 – 0,23
Obalno područje Istočnog Sredozemlja ⁽⁹⁾	52 - 680	1,2	6,6 – 7,9	0,03 - 0,17
Obalno područje srednjeg Jadrana (rezultati dobiveni u ovom radu)	28,4 - 392	2,6	8,32 – 11,1	0,03 - 0,2

/ - nisu poznate vrijednosti

5. ZAKLJUČCI

Na temelju eksperimentalno dobivenih rezultata elektrokemijskog (DPASV) određivanja parametara kapaciteta kompleksiranja bakra (CuCC) u otopljenoj frakciji uzoraka površinskog mikrosloja mora (SML) i potpovršinske vode (ULW) obalnog srednjeg Jadrana zaključeno je:

- Celulozno acetatni (CA) filteri veličine pora 0,45 μm nakon pretpripreme (ispiranja) prikladni su za filtriranje uzoraka kojima se određuju parametri CuCC.
- Prilikom određivanja parametara CuCC iznimno je važno odabrati pogodan potencijal akumulacije pri kojem će se selektivno reducirati labilno kompleksirana vrsta. Pogodan potencijal pri kojem se vrši akumulacija tijekom titracijskih mjerenja metodom DPASV odabire se na temelju snimljenog pseudopolarograma, a za naša je mjerenja odabran $E_a = -0,6 \text{ V}$.
- Kod uzoraka s visokim sadržajem otopljene organske tvari (DOC) moguće je smanjiti interferencije u vidu smanjivanja adsorpcije površinski aktivne organske tvari (PAT) na radnu elektrodu dodatkom modelne PAT T-X-100. Adsorbirani sloj T-X-100 ne utječe na elektrokemijsku redukciju labilnih vrsta bakra, a povećava osjetljivost detekcije bakra na način da povisuje struju oksidacije bakra. T-X-100 dokazano ima negativan učinak na adsorpciju prisutnih PAT, a pozitivan učinak na specijaciju bakra u otopini. Odabrana koncentracija T-X-100 u ovom radu bila je 1 mg/L.
- Korak desorpcije također u velikoj mjeri smanjuje učinke interferencija PAT i omogućuje bolji odziv elektrode te stvaranje dobro definiranog pika oksidacije bakra.
U ovom je radu odabran potencijal desorpcije $E_d = -1,4 \text{ V}$ u trajanju od 1 s.
- Porast vršne struje bakra povećava se dužim vremenom akumulacije, a odabrano vrijeme akumulacije za titracijska DPASV mjerenja iznosilo je 120 s.
- Porast struje bakra u titracijskim mjerenjima ovisan je o koncentraciji dodanih Cu^{2+} iona te o kapacitetu prisutnih organskih liganada za vezanjem dodanog Cu^{2+} u inertne komplekse.
- Prisustvo L_1 i L_2 liganada određeno je u uzorcima mikrosloja mora s koncentracijama $[L_1] = 40,50 - 76,1 \text{ nM}$ i $[L_2] = 28,4 - 392 \text{ nM}$, dok je za uzorke potpovršinske vode određena samo L_2 klasa liganada, $[L_2] = 19,9 - 69,6 \text{ nM}$.

- Vrijednosti uvjetnih konstanti stabilnosti za SML uzorke su bile u rasponu $\log K_{\text{CuL1}} = 10,34 - 11,11$ i $\log K_{\text{CuL2}} = 8,32 - 10,02$, a za ULW uzorke $\log K_{\text{CuL2}} = 9,51 - 10,18$.
- Otopljeni proteinski materijal prisutan u peludu unesenom atmosferskim taloženjem u površinski mikrosloj mora u travnju 2019. godine značajno doprinosi povećanju kapaciteta kompleksiranja bakra u tim uzorcima.
- Utjecaj otvorenog požara i Saharske prašine u vidu atmosferskog donosa organskih liganada na parametre CuCC u uzorcima SML i ULW tijekom perioda veljača-srpanj 2019. godine bio je zanemariv.
- Količina liganada po masi otopljenog organskog ugljika koja je kompleksirala Cu^{2+} za uzorke SML varira od 35,81 – 204,49 nmol/mg C, a u prosjeku iznosi 91,91 nmol/mg C, dok vrijednosti za ULW variraju od 24,24 – 75,57 nmol/mg C, a u prosjeku iznose 43,82 nmol/mg C, što znači da je veća količina liganada po masi otopljenog organskog C nađena za uzorke SML koji su imali višu koncentraciju DOC-a od uzoraka ULW.
- Na temelju dobivenog faktora obogaćenja za ukupne organske ligande $EF > 1$ zaključujemo da je površinski mikrosloj mora kao prvi milimetar morske površine u direktnom doticaju s atmosferom bogatiji organskim ligandima u odnosu na potpovršinsku vodu te da prisutan organski materijal u SML ne potječe iz vodenog stupca već iz atmosferskog donosa.
- Raspon koncentracija slobodnog bakra bio je od 2,3 do 46,1 pM, što nisu puno više vrijednosti od procijenjenih granica toksičnih koncentracija koje su oko 10 pM.
- Koncentracije otopljenog bakra bila je u statistički značajnoj ($p < 0,05$) slaboj pozitivnoj korelaciji ($r = 0,461$) s ukupnom koncentracijom prisutnih organskih liganada potvrđujući regulaciju optimalne biodostupne koncentracije bakra u prirodnim vodama kompleksiranjem s organskim ligandima.
- Na temelju usporedbe dobivenih rezultata za parametre CuCC s već objavljenim rezultatima za područje Norveških fjordova, područje SZ i Istočnog Sredozemlja, zaključujemo kako su u navedenim istraživanim SML uzorcima prisutna koncentracija organskih liganada i njihov afinitet za kompleksiranje bakra usporedivi s koncentracijama organskih liganada i prividnim konstantama stabilnosti kompleksa u srednjem Jadranu.

6. LITERATURA

1. Yang T, Chen Y, Zhou S, Li H. Impacts of aerosol copper on marine phytoplankton: A review. *Atmosphere (Basel)*. 2019;10(7).
2. Mahowald NM, Hamilton DS, Mackey KRM, Moore JK, Baker AR, Scanza RA, et al. Aerosol trace metal leaching and impacts on marine microorganisms. *Nat Commun*. 2018;9(1).
3. Guerzoni S, Chester R, Dulac F, Herut B, Loÿe-Pilot MD, Measures C, et al. The role of atmospheric deposition in the biogeochemistry of the Mediterranean Sea. *Prog Oceanogr*. 1999;44(1–3):147–90.
4. Pöschl U. Atmospheric aerosols: Composition, transformation, climate and health effects. *Angew Chemie - Int Ed*. 2005;44(46):7520–40.
5. Djaoudi K, Van Wambeke F, Barani A, Bhairy N, Chevaillier S, Desboeufs K, et al. Potential bioavailability of organic matter from atmospheric particles to marine heterotrophic bacteria. *Biogeosciences*. 2020;17(24):6271–85.
6. MacKey KRM, Van Dijken GL, Mazloom S, Erhardt AM, Ryan J, Arrigo KR, et al. Influence of atmospheric nutrients on primary productivity in a coastal upwelling region. *Global Biogeochem Cycles*. 2010;24(4).
7. Herut B, Rahav E, Tsagaraki TM, Giannakourou A, Tsiola A, Psarra S, et al. The potential impact of Saharan dust and polluted aerosols on microbial populations in the East Mediterranean Sea, an overview of a mesocosm experimental approach. *Front Mar Sci*. 2016;3(NOV):1–16.
8. Wurl O, Ekau W, Landing WM, Zappa CJ. Sea surface microlayer in a changing ocean - A perspective. *Elementa*. 2017;5.
9. Karavoltsos S, Kalambokis E, Sakellari A, Plavšić M, Dotsika E, Karalis P, et al. Organic matter characterization and copper complexing capacity in the sea surface microlayer of coastal areas of the Eastern Mediterranean. *Mar Chem*. 2015;173:234–43.
10. Engel A, Bange HW, Cunliffe M, Burrows SM, Friedrichs G, Galgani L, et al. The ocean's vital skin: Toward an integrated understanding of the sea surface microlayer. *Front Mar Sci*. 2017;4(MAY):1–14.

11. Stolle C, Ribas-ribas M, Badewien TH, Barnes J, Carpenter LJ, Chance R, et al. The MILAN Campaign. (October 2019):146–66.
12. Whitby H. Identifying the factors affecting copper speciation in estuarine , coastal and open ocean waters [PhD Thesis]. University of Liverpool; 2016;(September).
13. Lorenzo JJ, Nieto O, Beiras R. Effect of humic acids on speciation and toxicity of copper to *Paracentrotus lividus* larvae in seawater. *Aquat Toxicol.* 2002 Jul;58(1–2):27–41.
14. Richir J. Trace Elements in Marine Environments: Occurrence, Threats and Monitoring with Special Focus on the Coastal Mediterranean. *J Environ Anal Toxicol.* 2016;06(01):1–19.
15. Morel FMM, Price NM. The biogeochemical cycles of trace metals in the oceans. *Science* (80-). 2003;300(5621):944–7.
16. Sunda WG. Feedback interactions between trace metal nutrients and phytoplankton in the ocean. *Front Microbiol.* 2012;3(JUN):1–22.
17. Louis Y, Cmok P, Omanović D, Garnier C, Lenoble V, Mounier S, et al. Speciation of trace metals in natural waters: The influence of an adsorbed layer of natural organic matter (NOM) on voltammetric behaviour of copper. *Anal Chim Acta.* 2008;606(1):37–44.
18. Pesavento M, Alberti G, Biesuz R. Analytical methods for determination of free metal ion concentration, labile species fraction and metal complexation capacity of environmental waters: A review. *Anal Chim Acta.* 2009;631(2):129–41.
19. Ružić I. Theoretical aspects of the direct titration of natural waters and its information yield for trace metal speciation. *Anal Chim Acta.* 1982 Aug 1;140(1):99–113.
20. Town RM, Filella M. Dispelling the myths: Is the existence of L1 and L2 ligands necessary to explain metal ion speciation in natural waters? *Limnol Oceanogr.* 2000;45(6):1341–57.
21. Omanović D, Garnier C, Pižeta I. ProMCC: An all-in-one tool for trace metal complexation studies. *Mar Chem.* 2015;173:25–39.

22. Van Den Berg CMG. Determination of copper complexation with natural organic ligands in seawater by equilibration with MnO₂ I. Theory. *Mar Chem.* 1982 Aug 1;11(4):307–22.
23. Scatchard G. The attraction of proteins for small molecules and ions. *Ann N Y Acad Sci* 57. 1949;660–672.
24. Gerringa LJA, Herman PMJ, Poortvliet TCW. Comparison of the linear Van den Berg/Ružić transformation and a non-linear fit of the Langmuir isotherm applied to Cu speciation data in the estuarine environment. *Mar Chem.* 1995 Jan 1;48(2):131–42.
25. Pižeta I, Billon G, Omanović D, Cuculić V, Garnier C, Fischer JC. Pseudopolarography of lead (II) in sediment and in interstitial water measured with a solid microelectrode. *Anal Chim Acta.* 2005;551(1–2):65–72.
26. Tsang JJ, Rozan TF, Hsu-Kim H, Mullaugh KM, Luther GW. Pseudopolarographic determination of Cd²⁺ complexation in freshwater. *Environ Sci Technol.* 2006;40(17):5388–94.
27. Nicolau R, Louis Y, Omanović D, Garnier C, Mounier S, Pižeta I. Study of interactions of concentrated marine dissolved organic matter with copper and zinc by pseudopolarography. *Anal Chim Acta.* 2008;618(1):35–42.
28. Cukrov N, Cmok P, Mlakar M, Omanović D. Spatial distribution of trace metals in the Krka River, Croatia: An example of the self-purification. *Chemosphere,* 72(10). 2008;1559–66.
29. Wang J. *Analytical Electrochemistry.* John Wiley & Sons, New York. 2000;209 str.
30. Vukosav P, Mlakar M, Cukrov N, Kwokal Ž, Pižeta I, Pavlus N, Špoljarić I, Vurnek M, Brozinčević DO. Heavy metal contents in water, sediment and fish in a karst aquatic ecosystem of the Plitvice Lakes National Park(Croatia). *Env Sci Pollut Res,* [Internet]. Available from: DOI 10.1007/s11356-013-0A2377-3
31. Plavšić M, Krznarić D. The Electrochemical Processes of Copper in the Presence of Triton X-100. *Electroanal* 6. 1994;469–74.

32. Pađan J, Marcinek S, Cindrić A-M, Santinelli C, Retelletti Brogi S, Radakovitch O, et al. Organic Copper Speciation by Anodic Stripping Voltammetry in Estuarine Waters With High Dissolved Organic Matter. *Front Chem.* 2021;8(February):1–16.
33. Plavšić M, Gašparović B, Strmečki S, Vojvodić V, Tepić N. Copper complexing ligands and organic matter characterization in the northern Adriatic Sea. *Estuar Coast Shelf Sci* 85. 2009;299–306.
34. Omanović D, Garnier C, Louis Y, Lenoble V, Mounier S, Pižeta I. Significance of data treatment and experimental setup on the determination of copper complexing parameters by anodic stripping voltammetry. *Anal Chim Acta.* 2010;664(2):136–43.
35. Wael HM Abdelraheem, Zanaty R Komy NMI. Electrochemical determination of Cu²⁺ complexation in the extract of *E. crassipes* by anodic stripping voltammetry. *Arab J Chem* 10. 2017;S1105–S1110.
36. Del Pilar de Sá-Otero M, Armesto-Baztan S, Diaz-Losada E. Analysis of protein content in pollen loads produced in north-west Spain. *Grana*, 484. 2009;290–6.
37. Roulston TH, Cane JH. Pollen nutritional content and digestibility for animals. *Plant Syst Evol.* 2000;222(1–4):187–209.
38. Lorenzo JJ, Nieto-Cid M, Alvarez-Salgado XA, Perez P, Beiras R. Contrasting complexing capacity of dissolved organic matter produced during the onset, development and decay of a simulated bloom of the marine diatom *Skeletonema costatum*. *Mar Chem* 103. 2007;61–75.
39. Annett AL, Lapi S, Ruth TJ, Maldonado MT. The effects of Cu and Fe availability on the growth and Cu:C ratios of marine diatoms. *Limnol Oceanogr.* 2008;53(6):2451–61.
40. Guo J, Annett AL, Taylor RL, Lapi S, Ruth TJ, Maldonado MT. Copper-uptake kinetics of coastal and oceanic diatoms. *J Phycol.* 2010;46(6):1218–28.

41. Mann EL, Ahlgren N, Moffett JW, Chisholm SW. Copper toxicity and cyanobacteria ecology in the Sargasso Sea. *Limnol Oceanogr.* 2002;47(4):976–88.
42. Maldonado MT, Allen AE, Chong JS, Lin K, Leus D, Karpenko N, et al. Copper-dependent iron transport in coastal and oceanic diatoms. *Limnol Oceanogr.* 2006;51(4):1729–43.
43. Peers G, Quesnel SA, Price NM. Copper requirements for iron acquisition and growth of coastal and oceanic diatoms. *Limnol Oceanogr.* 2005;50(4):1149–58.
44. Gledhill M, Gerringa LJA. The effect of metal concentration on the parameters derived from complexometric titrations of trace elements in seawater—a model study. *Front Mar Sci.* 2017;4(AUG):1–15.
45. Gašparović B, Plavšić M, Čosović B, Saliot A. Organic matter characterization in the sea surface microlayers in the subarctic Norwegian fjords region. *Mar Chem.* 2007;105(1–2):1–14.
46. Gašparović B. Copper complexation and surfactant activity of organic matter in coastal seawater and surface microlayer samples of north Norwegian fjords and Mediterranean. *FRESEN ENVIRON BULL.* 2007;16-4(May 2014).
47. Plavšić M, Saliot A. Organic matter characterization in the sea surface microlayers in the subarctic Norwegian fjords region. *Mar Chem.* 2007;105:1–14.