

# **Vor-Ort-Charakterisierung von aquatischen Huminstoffen und ihren Metallspezies**

*Dissertation*

Zur Erlangung des akademischen Grades  
eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
des Fachbereichs Chemie der Universität Dortmund

vorgelegt von

*Lic. Johan Van den Bergh*

**Dortmund, 2001**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Juli 1997 bis Mai 2000 am Institut für Spektrochemie und Angewandte Spektroskopie (ISAS) in Dortmund durchgeführt.

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Januar 2001

Herrn Prof. Dr. D. Klockow danke ich für die nachhaltige Unterstützung dieser interessanten Arbeit am ISAS und die Übernahme der Betreuung.

Herrn Prof. Dr. T. N. Mitchell danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferates.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. P. Burba für sein Vertrauen, seine gute Hilfe und Diskussionsbereitschaft. Dies alles ermöglichte mir einerseits ein freies Arbeiten, andererseits bekam ich bei auftretenden Problemen eine sofortige und gute fachliche Hilfe.

Frau S. Funken danke ich freundlich für die Durchführung zahlreicher GFAAS-Bestimmungen.

Herrn U. Barth danke ich sehr für die gute Einweisung in die 2D-Fluoreszenz-Spektrometrie und den Kohlenstoffanalysator, sowie für seine Diskussionsbereitschaft und die lustigen Kaffeepausen.

Einen herzlichen Dank an Dr. S. Haiber für die guten Einführungen in die NMR-„Welt“, die Einweisung für das ICP-Gerät und für die Diskussionsbereitschaft.

Dr. J. Lambert und Ing. H. Herzog danke ich sehr für die vielen NMR-Aufnahmen und die guten Einführungen in der NMR-„Welt“.

Im Übrigen danke ich allen Mitarbeitern unserer Arbeitsgruppe für die freundschaftliche Aufnahme und die stete Hilfsbereitschaft.

Bei der Deutschen Forschungsgemeinschaft bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung.

Meiner Frau B. Van den Bergh danke ich sehr für die Durchsicht des Dissertationsmanuskripts und für die moralische Unterstützung in aller Hinsicht.

Meinen Eltern und Bruder, Familie und Freunden danke ich sehr für ihre Unterstützung und ihr Verständnis für meine häufige Abwesenheit.

## *Häufig verwendete Abkürzungen und Symbole*

A	Absorbanz
$A_{254}/A_{436}$	Verhältnis der Absorbanzen bei 254 und 436 nm
Abb.	Abbildung
AnEx-LC	Anionen-Austausch-Flüssig-Chromatographie, „Anion Exchange Liquid Chromatography“
AS	Atomspektrometrie
AAS	Atom-Absorptions-Spektrometrie
ASV	Anodische Strippingvoltammetrie
CE	Kapillarelektrophorese
$C_L$	Konzentration der labilen Metallspezies
COSY	Zweidimensionale Korrelationsspektroskopie, „2D-Correlation Spectroscopy“
CPMAS	Cross Polarization Magic Angle Spinning
D	Dialyse
Da	Dalton, g/mol
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff, „Dissolved Organic Carbon“
DPP	differentielle Pulspolarographie
EC	elementarer Kohlenstoff, „Elemental Carbon“
ED	Elektrodialyse
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FA	Fulvinsäure, „Fulvic Acid“
FAAS	Flammen-Atom-Absorptions-Spektrometrie
FFF	Feldfluß-Fraktionierung
GC	Gaschromatographie
GFAAS	Graphit-Ofen-Atom-Absorptions-Spektrometrie
GPC	Gelpermeations-Chromatographie
HA	Huminsäure, „Humic Acid“
HETCOR	Heteronuclear Correlation Spectroscopy
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HS	Huminstoff, „Humic Substances“
HYPHAN	1-(2-Hydroxyphenyl-azo)-2-naphtol
ICP-OES	Induktiv-gekoppeltes-Plasma-Optische-Emissions-Spektrometrie
IHSS	International Humic Substances Society
IMAC	immobilisierte-Metallchelate-Affinitäts-Chromatographie
IR	Infrarot(-Spektrometrie)
ISE	Ionenselektive Elektrode

$K_a$	thermodynamische Austauschkonstante
$K_i$	konditionelle thermodynamische Stabilitätskonstante
$\bar{K}$	summarische thermodynamische Stabilitätskonstante
$k_i$	Geschwindigkeitskonstante
$KK_{Me}$	konditionelle Komplexbildungskapazität für das Metall Me
L	Ligand
$L_K$	konkurrierende Liganden
MAC	Metallaffinitäts-Chromatographie
Me	Metall
$Me_K$	konkurrierende Metalle
MF	Mikrofiltration
MS	Massenspektrometrie
MST-UF	Mehrstufen-Ultrafiltration
MWG	Massenwirkungsgesetz
n.m.w.cut-off	nominal molecular weight cut-off
NDIR	nicht dispersiver Infrarot(-Detektor)
NF	Nanofiltration
NMR	Kernresonanzspektroskopie, „Nuclear-Magnetic-Resonance-Spektroskopie“
NOESY	Kern-Overhauser-Effekt-Spektroskopie, „Nuclear-Overhauser-Effect-Spectroscopy“
OC	organischer Kohlenstoff, „Organic Carbon“
P-UF	Parallel-Ultrafiltration
RO	umgekehrte Osmose, „Reversed Osmose“
ROS	refraktäre organische Substanzen
RPC	Umkehrphasen-Chromatographie, „Reversed Phase Chromatography“
RPLC	Umkehrphasen-flüssig-Chromatographie, „RP Liquid Chromatography“
SAK	Spektraler Absorptionskoeffizient $a(\lambda)$
SOC	partikulärer organischer Kohlenstoff, „Suspended Organic Carbon“
t	Zeit
$t_{1/2}$	Halbwertszeit
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TC	gesamter Kohlenstoff, „Total Carbon“
TRFA	Totalreflexions-Röntgenfluoreszenz-Analyse
UF	Ultrafiltration
UV/VIS	ultravioletter und sichtbarer Wellenlängenbereich
XAD 8	Austauscherharz zur Isolierung von Huminstoffen

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. HUMINSTOFFE IN AQUATISCHEN SYSTEMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2. VOR-ORT-ANALYTIK: MOTIVATION UND AUFGABENSTELLUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>3. CHARAKTERISIERUNG VON HUMINSTOFFEN</b> .....	<b>5</b>
3.1. DOC-BESTIMMUNGEN.....	5
3.2. ELEMENTARANALYSE.....	5
3.3. STRUKTURELLE CHARAKTERISIERUNG.....	6
3.4. LÖSUNGSSTRUKTUREN.....	11
3.5. FRAKTIONIERUNGSVERFAHREN .....	13
3.5.1. <i>Elektrophorese</i> .....	14
3.5.2. <i>Chromatographie</i> .....	15
3.5.3. <i>Größenklassierung</i> .....	17
3.5.3.1. Gelpermeationschromatographie.....	17
3.5.3.2. Membranfiltration .....	17
3.6. HUMINSTOFF/METALL-WECHSELWIRKUNGEN .....	21
3.6.1. <i>Metall-Komplexierungskapazität aquatischer Huminstoffe</i> .....	23
3.6.2. <i>Charakterisierung von Huminstoff-Metallkomplexen</i> .....	24
3.6.3. <i>Liganden- bzw. Metall-Austausch an Huminstoff-Metallkomplexen</i> .....	26
3.6.3.1. Austauschkinetik .....	27
3.6.3.2. Gleichgewichte .....	29
<b>4. EXPERIMENTE, ERGEBNISSE UND DISKUSSION</b> .....	<b>30</b>
4.1. PROBENNAHME .....	30
4.1.1. <i>Der Hohlohsee</i> .....	30
4.1.2. <i>Das Venner Moor</i> .....	31
4.1.3. <i>Der Arnsberger Wald</i> .....	32
4.1.4. <i>Referenz-Huminstoffe</i> .....	32
4.2. HUMINSTOFF-ISOLIERUNG .....	33
4.2.1. <i>XAD 8-Verfahren</i> .....	33
4.2.2. <i>Präparative Ultrafiltration</i> .....	34
4.3. BESTIMMUNG GELÖSTER HUMINSTOFFE .....	34
4.3.1. <i>DOC-Bestimmung mittels Kohlenstoffanalysator</i> .....	34
4.3.2. <i>Vor-Ort-Bestimmung mittels UV/VIS-Spektrometrie</i> .....	39
4.4. MOLEKÜLGRÖßENKLASSIERUNG MITTELS ULTRAFILTRATION.....	41
4.4.1. <i>Vor-Ort-Größenklassierung</i> .....	41
4.4.1.1. Mehrstufen-Ultrafiltration (Kaskadenverfahren) .....	41
4.4.1.2. Parallel-Ultrafiltration (Parallelverfahren) .....	44
4.4.2. <i>Metallverteilung in Größenfraktionen</i> .....	46

4.4.3. Strukturelle Untersuchungen .....	53
4.4.3.1. UV/VIS-Spektrometrie.....	53
4.4.3.2. NMR-Spektroskopie.....	55
4.4.3.3. 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie.....	59
4.5. LIGANDEN-AUSTAUSCH AN HUMINSTOFF-METALLSPEZIES .....	61
4.5.1. Vor-Ort-Austausch mit EDTA.....	63
4.6. BELADUNG GELÖSTER HS MIT METALLIONEN .....	76
4.6.1. Konditionelle Komplexierungskapazitäten .....	76
4.6.2. Thermodynamische Stabilitätskonstanten .....	77
4.7. METALL-AUSTAUSCH AN HUMINSTOFF-METALLSPEZIES .....	79
4.7.1. Vor-Ort-Austausch mit Cu(II)-Ionen .....	79
4.7.2. Cu(II)-Austausch an natürlichen, vorangereicherten und artifiziellen HS-Metallspezies.....	92
4.8. TRANSFORMATIONSVORGÄNGE IN HUMINSTOFFEN.....	94
4.8.1. Änderungen der Molekülgrößenverteilung.....	94
4.8.2. Änderungen der Metallgehalte, -komplexierungskapazitäten und -verfügbarkeiten .....	98
4.8.3. Strukturelle Veränderungen.....	106
<b>5. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....</b>	<b>110</b>
<b>6. GERÄTE- UND CHEMIKALIENLISTE.....</b>	<b>114</b>
<b>7. LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>116</b>

# 1. Huminstoffe in aquatischen Systemen

Die Huminstoffe (HS) sind in der Biosphäre weit verbreitet und stellen die Hauptsenke für refraktären organischen Kohlenstoff in Böden und Gewässern dar [1]. Aktuellen Schätzungen zufolge beläuft sich die Masse des schwer abbaubaren organischen Kohlenstoffs (als Element C gerechnet) in Boden-HS auf etwa 2 bis 3 x 10<sup>12</sup> t und in aquatischen HS auf etwa 1 x 10<sup>12</sup> t, rund fünf mal mehr als in der auf der Erde lebenden Biomasse vorhanden ist [2]. In Oberflächen-, Grund- und Meerwasser bestehen etwa 50 % des darin gelösten organischen Kohlenstoffs (Dissolved Organic Carbon, DOC) aus HS [3]. Sie entstehen durch komplizierte, erst zum Teil aufgeklärte mikrobielle Abbauprozesse aus pflanzlichen bzw. tierischen Rückständen, sowohl in aquatischen Systemen (aquatische HS) als auch in Böden (pedogene HS) [4]. Die wichtigsten pflanzlichen Ausgangsstoffe sind Cellulose und Lignin, z.Tl. auch Peptide. Aufgrund ihrer komplexen Genese sind HS keine einheitlichen Stoffe definierter Struktur, sondern polydisperse, kaum auftrennbare Mischungen sich ähnelnder Makromoleküle mit variierenden Molekülgrößenverteilungen, Strukturen und Funktionalitäten, die stark von ihrer Genese und dem Grad ihrer Humifizierung geprägt werden. Meistens bestehen HS aus einer Vielzahl von aliphatischen, aromatischen, Kohlenhydrat- und Peptid-Substrukturen, die irregulär miteinander verknüpft sind und zudem ein breites „Spektrum“ an funktionellen Gruppen aufweisen. Hinzu kommt noch, daß HS in aquatischen Systemen äußerst komplexe kolloidale Lösungsstrukturen ausbilden können [5]. HS-Gemische in Böden und Gewässern lassen sich grob nach ihrem Löslichkeitsverhalten in wässriger Phase in säurelösliche Fulvinsäuren (Fulvic acids, FA), säureunlösliche, aber alkalilösliche Huminsäuren (Humic acids, HA) und praktisch unlösliches Humin unterteilen.

Aufgrund ihrer strukturellen und funktionellen Vielfalt sind HS an zahlreichen Prozessen in der Umwelt beteiligt [6] und nicht zuletzt für die Fruchtbarkeit des Bodens verantwortlich [7]. Eine besondere Relevanz haben die HS auch für die Bindung, den Transport und die Deposition von organischen und anorganischen Schadstoffen, speziell von Pestiziden [8,9] und Schwermetallionen [10,11,12] in Böden und Gewässern. Gelöste und partikuläre HS verhalten sich prinzipiell wie makromolekulare, polyfunktionelle Komplexbildner, die insbesondere mit Schwermetallionen sehr stabile Komplexe bilden können [13]. Dadurch beeinflussen HS in vielen Gewässern nachhaltig die dort vorliegenden Metallbindungsformen. Bedingt durch ihre ausgeprägte Polyfunktionalität und -dispersität kommt es dabei zur Bildung von komplexen HS-Metallspezies-Mischungen, die nicht durch einheitliche Strukturen bzw. durch klassische thermodynamische Stabilitätskonstanten beschrieben werden können [14]. Die Stabilität aquatischer HS-Metallspezies, die quasi als ein Maß für ihre biologische „Verfügbarkeit“ anzusehen ist, setzt sich in verwickelter Weise aus

thermodynamischen und kinetischen Faktoren zusammen, wie aus aktuellen Arbeiten abzuleiten ist [15].

In Gewässern können HS und andere makromolekulare Stoffe komplizierte dynamische Hydrokolloide ausbilden, häufig in Verbindung mit anorganischen Wasserinhaltsstoffen, wie Elementoxidhydraten und Mineralstoffen. Natürliche Kolloide dieser Art, die zudem schnellen Veränderungen unterliegen können [16], zeigen z. T. starke Wechselwirkungen mit vielen Schadstoffen, einschließlich Schwermetallionen. Bislang existieren jedoch kaum zuverlässige Informationen über organisch geprägte Gewässerkolloide und die von ihnen gebildeten Schadstoffspezies. Die Charakterisierung von HS und ihren Wirkungen, insbesondere der Metallbindung, hat sich in der bisherigen HS-Forschung vorrangig auf isolierte HS, also auf einen operationell wesentlich veränderten „Ausschnitt“ des ursprünglichen Gewässerkolloids beschränkt. Bei ihrer konventionellen Isolierung werden aquatische HS jedoch zum einen einem relativ sauren Sorptionsprozeß an technischen Adsorbentien, z.B. XAD 8, und zum anderen einer stark alkalischen Elution unterworfen, wobei die ursprünglichen Metallspezies zwangsläufig einer hydrolytischen Spaltung unterliegen [17]. Die so gewonnenen HS bzw. artifiziell daraus nachgebildeten Modellspezies sind in ihren Strukturen bzw. Wirkungen wohl nur bedingt mit den ursprünglichen Metallspezies vergleichbar, wie in einer vorausgehenden Arbeit am Institut für Spektrochemie bereits gezeigt werden konnte [15]. Dabei wurde festgestellt, daß artifiziell erzeugte HS-Metallspezies generell eine schnellere und höhere Metall-Verfügbarkeit, beispielsweise gegenüber konkurrierenden Chelatbildnern wie etwa EDTA, aufwiesen als die ursprünglichen Spezies. Demnach sind die meisten bisherigen Arbeiten zur Metallspeziation in aquatischen HS, die lediglich mit Hilfe isolierter HS und Metallionen in vereinfachten Modellversuchen durchgeführt wurden, mit Skepsis zu betrachten [18]. Ihre unkritische Übertragung auf natürliche Metallspezies in HS-dominierten Gewässern ist kaum statthaft. Darüber hinaus ist zu berücksichtigen, daß natürliche HS-Metallspezies in Wasserproben schon bei ihrer Lagerung analytisch unerwünschten Transformationen unterliegen können [19], die bei ihrer nachgeschalteten Charakterisierung im Labor systematische Artefakte nach sich ziehen. Demnach ist die Metallspeziation in aquatischen HS, so wie sie bisher in vielen Arbeiten praktiziert wurde, mit erheblichen systematischen Unsicherheiten behaftet.

Eine zuverlässigere, wirklich „naturnahe“ Analytik von aquatischen HS und ihren ursprünglichen Metallspezies erfordert deshalb deren unmittelbare Charakterisierung am, wenn möglich sogar direkt im Gewässer. Aufgrund eines unzureichenden methodischen Instrumentariums war jedoch bisher eine derartige Vor-Ort- bzw. *in-situ*-Analytik an aquatischen HS-Metallspezies kaum möglich.



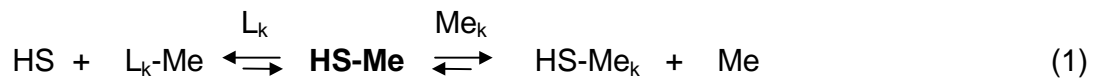
## 2. Vor-Ort-Analytik: Motivation und Aufgabenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, eine leistungsfähige, möglichst einfach zu handhabende Feldmethodik für die Vor-Ort-Charakterisierung aquatischer HS und ihrer kolloidalen Metallspezies in DOC-reichen Gewässern aufzubauen. Die Arbeit an diesem Projekt ist eingebettet in das aktuelle Sonderschwerpunktprogramm ROSIG (*Refraktäre organische Säuren in Gewässern*) der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Bereich der Wasserforschung. Das seit 1994 laufende Sonderschwerpunktprogramm DFG-ROSIG hat sich zum Ziel gesetzt, mit Hilfe neuer bzw. weiter entwickelter bekannter Methoden die Charakterisierung von „ROSIGs“ und ihrer Genese sowie der von ihnen beeinflussten Prozesse in Gewässern nachhaltig zu verbessern. Ein wesentlicher ROSIG-Kernpunkt war auch, die Kenntnisse über Strukturen bzw. Funktionalitäten aquatischer HS sowie die von ihnen gebildeten Metallspezies zu vertiefen.

Hydrokolloide in HS-haltigen Gewässern können bereits kurz nach Probenahme starken Veränderungen in ihrer Größenverteilung unterliegen [5]. Auf ähnlich signifikante Unterschiede zwischen „Molekülgrößen“-Verteilungen von HS und ihren natürlichen Metallspezies aus frisch geschöpften Referenzwasserproben und den hieraus isolierten Referenz-HS wurde auch im Rahmen eines vorausgehenden ROSIG-Projekts am ISAS hingewiesen [15]. Demnach sollten z.B. charakteristische Größenverteilungen von Hydrokolloiden und den von ihnen gebildeten natürlichen Metallspezies möglichst schon am oder besser noch im Gewässer erfaßt werden. Hierfür eignet sich in besonderer Weise die mehrstufige Tangentialfluß-Ultrafiltration (MST-UF) in der am ISAS konzipierten Kaskaden-Technik [20], die vom Prinzip her Spezies-Differenzierungen vor Ort bzw. *in-situ* ohne systemverändernde Hilfsstoffe, z.B. Puffer oder Elektrolyte, ermöglicht. Für diesen Zweck war im Rahmen der vorliegenden Arbeit eine einfach durchführbare Feldtechnik der MST-UF zu entwickeln, die möglichst rasche Vor-Ort-Fraktionierungen natürlicher Hydrokolloide und ihrer Metallspezies sowohl im „subpartikulären“ (< 0.45 bis 0.1 µm) als auch im „makro-molekularen“ Bereich (< 100 bis 1 kDa) erlaubte. Signifikante Verschiebungen der Größenverteilung von HS-reichen Hydrokolloiden in Referenzwasserproben, die sich eventuell während deren Lagerung ergaben, sollten ebenfalls mit dieser UF-Technik verfolgt werden.

Für die Bewertung natürlicher HS-Metallspezies und ihrer Prozesse ist es weniger von Bedeutung, deren genaue Strukturen zu ermitteln, als vielmehr, sie möglichst hinsichtlich ihrer Stabilität bzw. Labilität („Metall-Verfügbarkeit“) zu differenzieren. In der Laboranalytik an HS-Metallspezies werden hierfür mit Erfolg Ionenaustauschverfahren in Form von chromatographischen Fließtechniken eingesetzt [21,22]. In einem ROSIG-Projekt, das der vorliegenden Arbeit voranging, konnte bereits gezeigt werden, daß auch Austauschreak-

tionen mit gelösten Chelatbildnern, z.B. EDTA, kombiniert mit einer zeitkontrollierten Ultrafiltration, eine operationell einfache Differenzierung zwischen labilen und inerten HS-Metallspezies in wäßrigen Proben ermöglichen. Für die hier angestrebte Vor-Ort-Charakterisierung aquatischer HS-Metallspezies (HS-Me) nach ihrer „Metall-Verfügbarkeit“ erschienen deshalb Austauschreaktionen mit konkurrierenden Liganden ( $L_k$ ) bzw. Metallionen ( $Me_k$ ), wie im nachstehenden Schema skizziert, besonders aussichtsreich:



Aus der Kinetik bzw. den Gleichgewichten dieser Austauschreaktionen, als Feldtechnik am Gewässer durchgeführt, lassen sich differenzierende Aussagen zur kinetischen bzw. thermodynamischen Stabilität der vorliegenden HS-Me ableiten. Natürliche HS-Me, die sich auch nach längerer Reaktionszeit nicht an derartigen Umsetzungen beteiligen, werden operationell als „inert“ eingestuft. Zur eigentlichen Quantifizierung der vor Ort differenzierten Metallspezies dienen anschließend konventionelle atomspektrometrische Labormethoden (z.B. AAS, ICP-OES, TRFA). Der so konzipierte Verbund aus Vor-Ort-Differenzierung und instrumentellen Bestimmungen im Labor sollte eine möglichst zuverlässige „kinetische“ und „thermodynamische“ Speziation an realen, nicht durch Proben transport und -lagerung eventuell veränderten HS-Me ermöglichen. Zum Vergleich können *in-vitro* erzeugte HS-Me aus isolierten HS und verschiedenen Metallionen herangezogen werden. Die Differenzierung labiler/inerter HS-Me mittels Liganden- bzw. Metallaustausch sollte außerdem gewisse Rückschlüsse über die biologische Verfügbarkeit der entsprechenden Me im Gewässer erlauben. Liganden- wie auch Metallaustausch sind zudem natürliche Transformationswege realer HS-Me, über die bisher kaum etwas bekannt ist.

Aquatische HS und ihre HS-Me, die mit Hilfe der neu entwickelten Methodik vor Ort fraktioniert bzw. charakterisiert wurden, sollten auch mittels molekülspektroskopischer Labormethoden, z.B. UV-VIS, Fluoreszenz,  $^1H$ - und  $^{13}C$ -NMR, auf strukturelle Unterschiede hin untersucht werden.

Insgesamt war zu erwarten, daß das hier skizzierte methodische Instrumentarium einen wesentlichen Beitrag zu einer vertieften Analytik von aquatischen HS und ihren Metallspezies in Gewässern leisten kann.

### 3. Charakterisierung von Huminstoffen

Die strukturelle bzw. chemische Charakterisierung von aquatischen HS in Hinblick auf ihr Metallbindungsvermögen erfordert in der Regel deren vorhergehende Isolierung bzw. Anreicherung aus Gewässerproben. Eine derartige Probenvorbereitung ist jedoch prinzipiell mit dem Risiko systematischer Veränderungen an den HS verbunden, da diese bei der Abtrennung pH-Änderungen zwischen pH 2-13 durchlaufen. Eine prinzipiell wünschenswerte *in-situ*-Analytik von HS, also ihre direkte Charakterisierung im Gewässer oder zumindest in der ursprünglichen Wasserprobe, ist bisher auf wenige vor Ort durchführbare Methoden, z.B. Ionenselektive Elektrode (ISE) [23], beschränkt. Eine detailliertere Charakterisierung von HS erfordert ein enges Zusammenspiel leistungsfähiger Methoden einschließlich geeigneter Trennverfahren.

#### 3.1. DOC-Bestimmungen

Aquatische HS bestehen zu rund 50 % aus organischem Kohlenstoff [24]. Deshalb ist der gelöste organische Kohlenstoff (DOC) eine wichtige Kontrollgröße für die HS-Massenbilanz bei Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren und hat sich als operationelles Maß für die gelösten HS-Konzentrationen etabliert [24]. Der HS-Gehalt in aquatischen Systemen kann stark variieren und beträgt im Meerwasser ungefähr 0.1, in Flüssen 3.5 und in Mooregebieten 10 mg/L und mehr. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DOC-Bestimmungen mit Hilfe eines speziellen Kohlenstoffanalysators durchgeführt, der am ISAS entwickelt wurde und unter Punkt 4.3.1. näher erläutert wird [25]. Mit Hilfe dieses Analysators kann organischer Kohlenstoff unter verschiedenen definierten Bedingungen, z.B. Temperatur, Katalysator und Temperatur/Zeit-Rampe, zu CO<sub>2</sub> verbrannt und durch einen CO<sub>2</sub>-NDIR-Detektor quantifiziert werden.

#### 3.2. Elementaranalyse

Die Elementaranalyse von HS dient als wichtige Basisgröße für die Quantifizierung von Partialstrukturen [24]. Im allgemeinen bestehen HS aus etwa 50 % C, 35 % O, 5 % H, 2-3 % N, 0.5-2 % S und 1-5 % mineralischer „Asche“, die operationell als anorganischer Rückstand von HS definiert ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Kohlenstoffgehalt der HS mit Hilfe des oben genannten Kohlenstoffanalysators bestimmt.

### 3.3. Strukturelle Charakterisierung

Aufgrund ihrer extrem hohen Komplexität und der Tatsache, daß es kaum völlig gleiche HS-Moleküle in einer Probe oder Fraktion gibt, ist es nicht möglich, HS durch einfache chemische Strukturformeln darzustellen. In den letzten dreißig Jahren wurde jedoch eine Reihe von Modellen entwickelt, um HS-Strukturen zu veranschaulichen und ihr Verhalten in der Umwelt zu verstehen. Diesbezügliche Strukturvorschläge wurden beispielsweise von Buffle (1977) [26], Schnitzer (1978) [27] und von Stevenson (1982) [4] gemacht. Aktuelle Computerberechnungen durch Schulten und Leinweber (1996) ergaben Strukturvorschläge (z.B. Abb. 1), die auf Elementaranalysen, Pyrolyse, spektroskopischen Analysen, Elektronenmikroskopie, oxidativem und reaktivem Abbau sowie Kolloiduntersuchungen basieren [28]. Anorganische Partialstrukturen sind, obwohl aufgrund der Elementaranalyse postuliert, mit den genannten Methoden nicht erfassbar. Eine ähnlich komplexe dreidimensionale Struktur, die auch die Komplexierung von Schwermetallen berücksichtigt, wurde von Kleinhempel (1970) entwickelt [29]. In Anlehnung an das Kleinhempel-Modell zeigt Abbildung 2 ein fiktives HS-Molekül mit verschiedenen Partialstrukturen, die sich summarisch aus am ISAS gewonnenen NMR-Daten von aquatischen HS ableiten lassen.

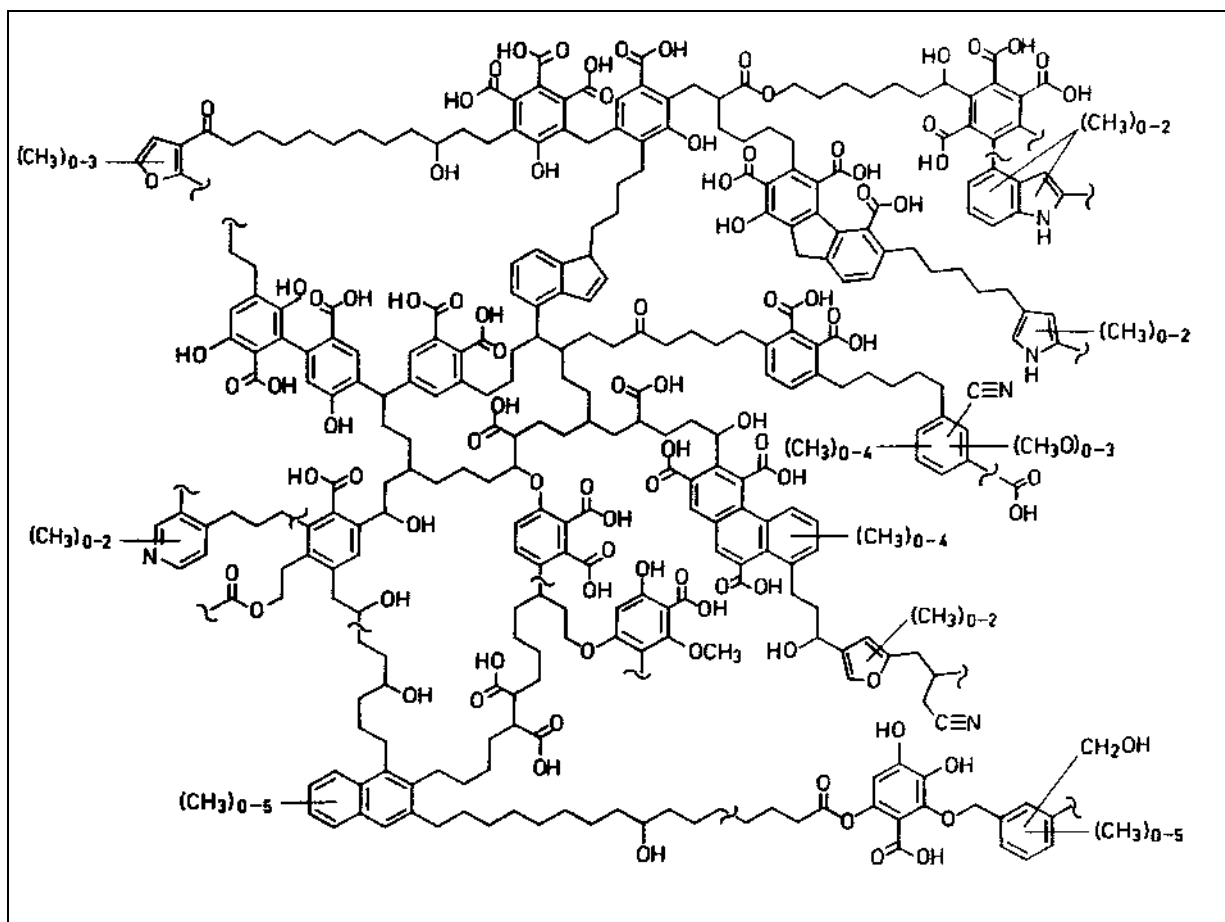
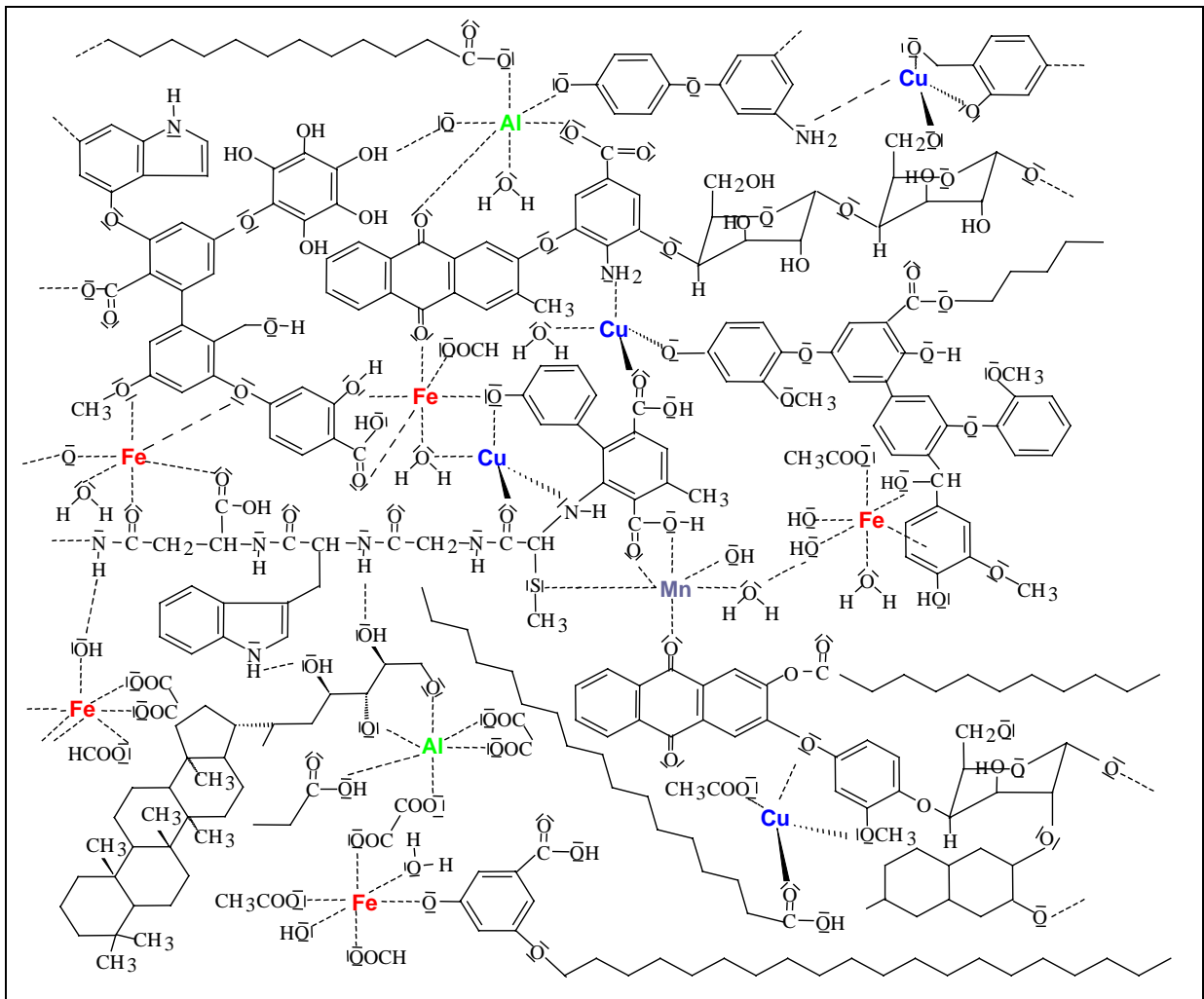


Abb. 1: Hypothetisches HS-Molekül nach Schulten und Leinweber [26]



**Abb. 2:** Hypothetisches HS-Molekül

Die vorgeschlagenen Strukturen für aquatische HS-Moleküle sind lediglich als anschauliche Modelle zu verstehen. Experimentelle Daten über HS belegen, daß diese über eine „flexible“ Struktur verfügen, die aus einzelnen Bausteinen besteht. In Lösung werden sie durch inter- oder intramolekulare Bindungen (Wasserstoffbrücken, elektrostatische und ionische Wechselwirkungen) zusammengehalten, wobei diese Aggregation von der HS-Konzentration, dem pH-Wert und der Ionenstärke abhängt [30]. Der folgende Abschnitt gibt einen Überblick über wichtige molekulspektroskopische Methoden, die für die strukturelle Charakterisierung von HS genutzt werden:

### **UV/VIS-Spektroskopie**

HS-Moleküle lassen sich durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 200 und 800 nm in einen elektronisch angeregten Zustand überführen. Im UV-Bereich (200-380 nm) absorbieren HS in der Regel durch Anregung von delokalisierten Elektronensystemen wie z.B. O ( $n \rightarrow \pi^*$ ) in C=O oder  $\pi \rightarrow \pi^*$  -Übergänge in Aromaten, im VIS-Bereich durch Anregung von freien Elektronenpaaren und „Charge Transfer“-Banden in chinoiden Strukturen oder in konjugierten ungesättigten C=C-, C=O-

und N=O-Strukturen [31]. Hiermit läßt sich auch die gelb-braune Farbe von HS-Lösungen erklären. Insgesamt zeigen HS und ihre Fraktionen, z.B. HA und FA, unstrukturierte UV/VIS-Spektren. Mit steigender Wellenlänge nimmt ihre optische Dichte kontinuierlich ab. Chen [32] konnte zeigen, daß das Absorbanz-Verhältnis bei den Wellenlängen 465 und 665 nm ( $A_{465}/A_{665}$ ) größer wird, wenn der Anteil kondensierter aromatischer Strukturen im Gemisch abnimmt. In der Wasseranalytik wird häufig der spektrale Absorptionskoeffizient (SAK,  $a(\lambda)$ ) verwendet, der unter Punkt 4.3.2. erläutert wird [33] und für HS-Konzentrationsbestimmungen nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz genutzt werden kann [34].

### **IR-Spektroskopie**

Wie andere organische Makromoleküle lassen sich HS-Moleküle durch Absorption von elektromagnetischer Strahlung mit einer Wellenlänge zwischen 2500 und 25000 nm (Wellenzahl  $\bar{\nu}$  4000 bis 400  $\text{cm}^{-1}$ ) in angeregte Schwingungszustände überführen. Die resultierenden IR-Spektren der HS weisen eine Reihe charakteristischer Banden auf, aus denen die Existenz HS-typischer funktioneller Gruppen abgeleitet werden kann. Die hierbei ermittelten Wellenzahlen sind von den Massen der Atome und von der Stärke der Bindungen zwischen den Atomen im Molekül abhängig, die an der Schwingungsbewegung beteiligt sind, wie Gleichung (2) verdeutlicht.

$$\bar{\nu} = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{M_r}} \quad (2)$$

Hierbei ist  $\bar{\nu}$  die Resonanzwellenzahl,  $c$  die Lichtgeschwindigkeit,  $k$  die Kraftkonstante der Bindung und  $M_r$  die reduzierte Masse.

Um ein IR-Spektrum aufnehmen zu können, muß eine Änderung des elektrischen Dipolmoments  $\mu$  im Molekül auftreten. Die Grundlagen der IR-Spektroskopie, wie sie bei der HS-Charakterisierung genutzt wird, werden eingehend in [35] behandelt. Die konventionelle IR-Spektroskopie liefert detaillierte Aussagen über wichtige funktionelle Gruppen bzw. Unterstrukturen in HS, wie z.B. O-H (Alkohole, Carbonsäuren, Phenole), C-H (Aliphate), C=C (Aromaten), C=O (Aldehyde, Carbonsäuren, Ester, Ketone), C-O (Carbonsäuren, Ether, Polysaccharide) und -NH (Aminosäuren).

Schwankende spektrale Absorptionskoeffizienten der in den HS-Molekülen vorliegenden Unterstrukturen erlauben jedoch keine zuverlässige Quantifizierung.

### **Fluoreszenz-Spektroskopie**

Wenn man organische Moleküle, wie z.B. HS, mit UV/VIS-Strahlung anregt, gehen sie von einem elektronischen Grundzustand in einen elektronisch angeregten Zustand über. Durch Schwingungsrelaxation wechseln die meisten Moleküle wieder in den Grundzustand, wobei die freiwerdende Energie durch Stoßprozesse mit der Umgebung als Wärme abgegeben wird. Einige Moleküle senden jedoch einen Teil dieser Energie als elektromagnetische Strahlung (Fluoreszenz) aus. Die Fluoreszenzstrahlung besitzt deshalb eine größere Wellenlänge als die anregende Strahlung, was durch das Jabłoński-Diagramm verdeutlicht wird [36]. Fluoreszenzspektren von HS bestehen aus vielen leicht unterschiedlichen Signalen fluorophorer Gruppen. Deshalb erhält man kaum aufgelöste Fluoreszenzsignale. Die Fluoreszenzspektroskopie ist demnach wenig geeignet für eine Charakterisierung funktioneller Gruppen in HS. Die Fluoreszenzintensität der HS nimmt jedoch durch Bindung von Metallen oder Xenobiotika stark ab („Quenching“), was zur Charakterisierung dieser Wechselwirkungen genutzt werden kann [8,37,38,39]. Fluorophore Gruppen der HS sind z.B. konjugierte Doppelbindungen und aromatische Ringsysteme.

### **NMR-Spektroskopie**

Die NMR-Spektroskopie hat sich in den letzten zwanzig Jahren als wichtigste Methode zur strukturellen Charakterisierung von HS etabliert [40]. Bei der NMR-Spektroskopie von HS werden, wie bei anderen organischen Molekülen [36], durch Radiowellen Übergänge zwischen magnetischen Energiezuständen von Atomkernen angeregt, die sich in einem äußeren Magnetfeld befinden. Atomkerne, die eine ungerade Anzahl an Protonen und/oder eine ungerade Anzahl an Neutronen besitzen, haben eine Kernspinquantenzahl  $I \neq 0$  (z.B.  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{27}\text{Al}$ ,  $^{29}\text{Si}$ ,  $^{31}\text{P}$ ) [41,42]. Diese Atomkerne sind NMR-aktiv und kommen auch für die NMR-Spektroskopie von HS in Frage. Die NMR-Spektroskopie liefert damit bei der strukturellen Charakterisierung von HS wertvolle Informationen und besitzt den großen Vorteil gegenüber anderen analytischen Methoden, daß sie quantitative Strukturinformationen liefert. Sie hat jedoch den Nachteil, daß sie relativ unempfindlich ist. So können  $^{13}\text{C}$ -NMR-Messungen mehrere Tage dauern, ehe ein auswertbares Signal/Rausch-Verhältnis der Signale erreicht wird. Aufgrund der Komplexität der HS sind die  $^1\text{H}$ -NMR-Aufnahmen wenig aufgelöst; in Kombination mit der  $^{13}\text{C}$ -NMR können aber Partialstrukturen in HS quantifiziert werden.  $^1\text{H}$ -NMR-Spektren von HS lassen sich in vier verschiedene Signalbereiche unterteilen, während aus ihren  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren fünf verschiedene Strukturbereiche abgeleitet werden können. Die chemischen Verschiebungsbereiche  $\delta$  der  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR von gelösten HS werden in Tabelle 1 dargestellt [43].

**Tab. 1:** Typische Integrationsbereiche in  $^1\text{H}$ - bzw.  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektren von HS

$\delta$ $^1\text{H}$ -NMR, ppm	Protonentyp	$\delta$ $^{13}\text{C}$ -NMR, ppm	Kohlenstofftyp
0 – 1.6	$\text{CH}_n\text{-C}$ (aliphatisch)	0 - 50	$\text{CH}_n$ (aliphatisch)
1.6 – 3.0	$\text{CH}_n\text{-CO}$ , $\text{CH}_n\text{-CN}$ , $\text{NCH}_n\text{-Aryl}$	60 - 100 100 - 160	$\text{CH}_n\text{-O}$ , $\text{CH}_n\text{-N}$ C (aromatisch)
3.3 – 4.5	$\text{CH}_n\text{-OR}$	160 - 190	C (carboxylisch)
5.5 – 9.0	H (aromatisch)	190 - 230	C (carbonylisch)

Neuere NMR-Pulstechniken erlauben sogar die Aufnahme von NMR-Spektren, in denen nur noch Signale bestimmter Strukturelemente auftreten, wie z.B. isolierte paraffinische Methylgruppen mittels  $^1\text{H}$ -Spinecho-NMR [43]. Auch zweidimensionale NMR-Methoden (2D-NMR) werden mit zunehmendem Erfolg für die HS-Charakterisierung genutzt [44,45]. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über wichtige 2D-NMR-Methoden, die prinzipiell zur Charakterisierung von HS genutzt werden können. Die diesbezüglichen Grundlagen der NMR-Spektroskopie werden ausführlich von Günther diskutiert [46]. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, HS mittels Festkörper-NMR zu untersuchen. Festkörper-NMR-Spektren für die Kerne  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  werden für HS mit der CPMAS-Technik (Cross Polarization Magic Angle Spinning) aufgenommen [47]. Dabei rotiert die Probe in einem Winkel von  $54.7^\circ$  zum äußeren Magnetfeld. Die Rotationsfrequenzen liegen zwischen 4 und 25 kHz. Diese Rotation soll die Anisotropie der chemischen Verschiebung, die zu starken Verbreiterungen in den Festkörper-NMR-Spektren führt, eliminieren. Zusätzlich wird durch „High Power Decoupling“ die starke dipolare Spin-Spin-Kopplung zwischen  $^1\text{H}$ -Kernen und dem zu messenden Kern ( $^{13}\text{C}$  oder  $^{15}\text{N}$ ) aus den Spektren entfernt.

Es resultieren Spektren mit Linien von 1 bis 2 Hz Breite, d.h. mit Linien, die nur wenig breiter sind als solche in Flüssigkeits-NMR-Spektren. Die Quantifizierung von Festkörper-NMR-Spektren wird erschwert durch die Abhängigkeit der Signalintensitäten von der Größe der dipolaren Kopplung. Diese ist für quartäre Kohlenstoffatome kleiner als für protonierte, d.h. quartäre Kohlenstoffsignale erscheinen mit geringerer Intensität als die Signale protonierter Kohlenstoffatome. Auch Methylgruppen zeigen relativ kleine dipolare Kopplungen und sind daher im Spektrum unterrepräsentiert.



**Tab. 2:** Übersicht von 2D-NMR-Methoden für aquatische Huminstoffe

Methoden	strukturelle Information
NOESY	$^1\text{H} - ^1\text{H}$ , räumliche Kopplung
H,H-COSY	$^1\text{H} - ^1\text{H}$ , über 2 und 3 Bindungen
HETCOR	$^{13}\text{C} - ^1\text{H}$
HMQC	$^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ , inverse Detektion

### ***Pyrolyse-GC-MS***

Sehr häufig werden zur Charakterisierung aquatischer HS auch Pyrolysemethoden eingesetzt [28]. Durch eine Pyrolyse von HS entstehen hunderte von Einzelverbindungen, die mittels Gaschromatographie (GC) getrennt und mittels Massenspektrometrie (MS) detektiert werden können [48,49]. Dies geschieht „on-line“ durch die Kopplung Pyrolyse-GC-MS. Da aber meist nur rund 10 % der ursprünglichen HS im Pyrolysat zugeordnet werden können, sind selbst semiquantitative Aussagen kaum möglich. Es weiteres Problem ist, daß man wegen der drastischen Reaktionsbedingungen bei der Pyrolyse nicht zwischen primären Spaltprodukten und den durch Sekundärreaktionen entstandenen Verbindungen unterscheiden kann.

## **3.4. Lösungsstrukturen**

Niedermolekulare organische Verbindungen sind allgemein durch eine charakteristische molare Masse gekennzeichnet, die eindeutig bestimmt werden kann. Organische Makromoleküle lassen sich in zwei Kategorien unterteilen. Zum einen in homogene, einheitliche Makromoleküle, bei denen alle Moleküle die gleiche molare Masse haben (monodispers) und zum anderen in polydisperse Makromoleküle, die durch eine breite Verteilung der molaren Masse gekennzeichnet sind. Für aquatische HS-Moleküle ist eine sehr breite molare Massenverteilung von 1 kDa bis 1000 kDa typisch. Gelöste HS sind deshalb als polydisperse Mischung von Makromolekülen anzusehen. In natürlichen Gewässern liegen HS häufig auch als Schwebstoffe vor, deren Teilchengrößen meist im Bereich von 0.05 bis 10  $\mu\text{m}$  liegen [20]. Konventionelle Methoden, die zur Molmassenbestimmung von HS eingesetzt werden, liefern lediglich mittlere Molmassen. Häufig werden mittlere Molmassen von HS wie folgt beschrieben [50]:

- Die über die Molekülzahl gemittelte Molmasse  $\bar{M}_n$  (number average weight):

$$\bar{M}_n = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n n_i}, \quad (3)$$

wobei  $n_i$  die Anzahl der betrachteten Moleküle  $i$  und  $M_i$  die molare Masse jedes einzelnen Moleküls  $i$  darstellt.

- Die über das Gewicht gemittelte Molmasse  $\bar{M}_w$  (weight average weight):

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^n w_i \cdot M_i}{\sum_{i=1}^n w_i} \quad (4)$$

Ersetzt man  $w_i = n_i \cdot M_i$ , dann erhält man:

$$\bar{M}_w = \frac{\sum_{i=1}^n n_i \cdot M_i^2}{\sum_{i=1}^n n_i \cdot M_i} \quad (5)$$

Die gemessenen mittleren Molmassen von HS sind vom physikalischen Prinzip der eingesetzten Meßtechnik abhängig. So bestimmt man  $\bar{M}_n$  über kolligative Eigenschaften wie Gefrierpunktserniedrigung oder Osmose [51,52],  $\bar{M}_w$  mittels Streumethoden (z.B. Röntgenkleinwinkelstreuung) [53,54], Gelpermeationschromatographie [55,56] und Ultrazentrifugation [57,58]. Für monodisperse Makromoleküle ist  $\bar{M}_n = \bar{M}_w$ , für polydisperse dagegen ist  $\bar{M}_w > \bar{M}_n$ . Das Verhältnis  $\bar{M}_w / \bar{M}_n$  ist als Maß für die Polydispersität von Makromolekülen nutzbar. Werte zwischen eins und zwei zeigen eine beträchtliche und solche von größer als zwei eine extrem hohe Polydispersität der vorliegenden Moleküle an. Da  $\bar{M}_n$  sehr stark durch die Zahl kleiner Moleküle beeinflusst wird, hat sich  $\bar{M}_w$  für die Charakterisierung von HS als besser geeignet erwiesen [59].

Generell sind HS von polydispenser Natur. Gelöste HS besitzen keine starre globuläre Gestalt, wie früher angenommen wurde [60]. Nach neueren Untersuchungen bilden HS in Lösung flexible Ellipsoide, die eine willkürlich gewickelte polymere Konformation haben können [61,62]. Aus weiteren Studien hat man auch kugelförmige und fadenförmige HS-Strukturen abgeleitet, die durch die Konzentration der HS, den pH-Wert und die Ionenstärke der Lösung veränderbar sind [63]. Neueste Messungen an HS mittels Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) zeigten, daß mit zunehmendem pH-Wert oder HS-

Konzentration ein geflochtenes Netzwerk von verlängerten Fasern entsteht, die schließlich zu einer blattartigen gelöcherten Struktur zusammenwachsen. Aufgrund dieser Struktur können HS auch andere organische sowie anorganische Wasserinhaltsstoffe an sich binden [64]. HS in Lösungen bilden auch micellare Strukturen aus, die durch Wasserstoffbrücken,  $\pi$ -Bindungen und hydrophobe Wechselwirkungen aus HS-Molekülen entstehen [65]. So haben Barak and Chen micellare HS-Strukturen in Lösung nachgewiesen, bei denen sich die hydrophilen Gruppen an der Grenzfläche und die hydrophoben im Inneren befinden [66]. Demnach sind HS nicht durch einfache Lösungsstrukturen zu beschreiben, sondern eher als variables kolloidales System. In Gewässern sind HS an einer großen Zahl von Prozessen wie Sorption und Ionenaustausch beteiligt, die zu ihrer Koagulation führen. Wasserstoffbrückenbindungen sind die Hauptursache der HS-Koagulation, aber auch Dipol-Dipol- und Van-der-Waals-Wechselwirkungen, elektrostatische Anziehungskräfte und Komplexbildung mit Charge-transfer-Übergängen tragen zu ihrer Koagulation bei. Elektrostatische Abstoßung und sterische Hinderung zwischen HS-Molekülen, z.B. bei erhöhtem pH-Wert, hemmen hingegen die HS-Koagulation. In aquatischen Systemen verläuft die Koagulation von HS meist reversibel. HS in Gewässern können deshalb als dynamische Aggregate betrachtet werden, die Bestandteile eines komplexen, leicht veränderlichen Hydrokolloids sind.

### **3.5. Fraktionierungsverfahren**

Aquatische HS sind, wie gerade betrachtet, extrem komplexe, kaum auftrennbare Mischungen sich ähnelnder Polyelektrolyte. Aufgrund dieser Komplexität sowie der sehr geringen Zahl gleicher oder zumindest isomerer HS-Moleküle ist bisher kein Hochleistungs-Trennverfahren für HS-Moleküle verfügbar, allenfalls Fraktionierungsverfahren. Eine Fraktionierung von gelösten HS und ihren Metallspezies kann durch deren unterschiedliche Löslichkeit, durch ihre Wechselwirkung mit hydrophoben, hydrophilen oder metallbeladenen Trennphasen, ihre unterschiedliche Beweglichkeit in elektrischen Feldern sowie ihre unterschiedlichen Molekülgrößen erreicht werden. Diesbezügliche Fraktionierungsverfahren und Literaturhinweise werden in Tabelle 3 zusammengefaßt. Sie ermöglichen eine deutliche Herabsetzung der Polydispersität in natürlichen HS-Gemischen und damit differenzierende Untersuchungen, in welcher Weise Strukturen, Funktionalitäten und deren Wirkungen, z.B. das Metallbindungsvermögen in HS, verteilt sind.

**Tab. 3:** Fraktionierungsverfahren für HS

Trennverfahren	Fraktionen	Literatur
saure und basische Extraktion	Fulvinsäure, Huminsäure, Humin	[67]
organische Lösungsmittel-Extraktion	nach Löslichkeit, diskrete Fraktionen	[68]
Umkehrphasen-Chromatographie (RPC)	ein bis zwei Signale	[69]
Gelpermeations-Chromatographie (GPC)	breite Verteilung nach Molekülgrößen	[70]
Metallaffinitäts-Chromatographie (MAC)	drei bis vier Fraktionen	[15]
Elektrophorese	„Fingerprint“, je nach HS	[71]
Kapillarelektrophorese (CE)	„Fingerprint“ im Fall von niedermolekularen HS	[72,73]
Feldfluß-Fraktionierung (FFF)	breite Verteilung	[74,75]
Ultrazentrifugation	getrennte Fraktionen nach Molekülgröße	[57]
Mehrstufen-Ultrafiltration (MST-UF)	operationelle Fraktionen	[76]

Die nächsten Abschnitte erläutern kurz das Prinzip, die Vor- und Nachteile von häufig benutzten Trennverfahren für aquatische HS.

### 3.5.1. Elektrophorese

Aquatische HS verfügen meist über beträchtliche Gehalte an geladenen funktionellen Gruppen, insbesondere Carboxylgruppen und phenolischen Funktionen [77]. Diese ermöglichen ihre prinzipielle Trennung in elektrischen Feldern, z.B. bei der Elektrophorese.

Unter Elektrophorese versteht man die Wanderung geladener Teilchen, z.B. HS-Polyanionen, in einem elektrischen Feld. Bei der Kapillarelektrophorese (CE) wird eine mit Elektrolyt gefüllte Kapillare als geeigneter Träger benutzt. Die Trennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeiten ( $v$ ) der geladenen Teilchen. Sie ist abhängig von der Form, der Größe und der Ladung der Teilchen, dem pH-Wert, der Temperatur, der Viskosität ( $\eta$ ) und der elektrischen Feldstärke ( $E$ ). Die Kraft ( $F$ ), die ein Ion mit Ladung  $q$  in einem angelegten elektrischen Feld ( $E$ ) erfährt, ist:

$$F = q \cdot E \quad (6)$$

Bei der Bewegung in Lösung wirkt dieser elektrostatischen Kraft die Stokessche Reibungskraft, entgegen:

$$F = 6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta \cdot v \quad (7)$$

Dies gilt für ein kugelförmiges Teilchen mit Radius  $r$ . Das Ion bewegt sich mit konstanter Geschwindigkeit  $v$  in Richtung der entgegengesetzt geladenen Elektrode (aus Gl. (6) und (7)):

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (8)$$

Seine Geschwindigkeit bei einer Feldstärke von 1 V/cm wird definiert als elektrophoretische Mobilität  $\mu_{ep}$ :

$$\mu_{ep} = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta} \quad (9)$$

Die elektrophoretische Mobilität wird jedoch häufig durch den sogenannten elektroosmotischen Fluß (EOF) überlagert, der aktiv zum Proben-transport beiträgt.

Die beobachtete Mobilität der Ionen setzt sich aus einem elektrophoretischen und einem elektroosmotischen Anteil zusammen. Bei der Kapillarelektrophorese benutzt man meistens „Fused-Silica“-Kapillaren ( $\text{Si-O}^-$  an der Oberfläche), und der EOF ist stark vom pH-Wert und vom Elektrolyten abhängig. Aus aktuellen CE-Arbeiten geht hervor, daß sich aquatische HS in effizienter Weise mit dieser Methode fraktionieren lassen [73,78,79,80]. Der große Nachteil ist, daß man bei solchen pH-Werten und Elektrolytkonzentrationen arbeiten muß, bei denen schon Änderungen an den natürlichen HS und ihren Metallspezies auftreten, denn meistens werden Phosphat-, Formiat- oder Boratpuffer benutzt.

Aus den angeführten Gründen kommen elektrophoretische Verfahren für die Vor-Ort-Charakterisierung von aquatischen HS und deren Spezies kaum in Frage.

### 3.5.2. Chromatographie

Chromatographische Verfahren spielen bei der konventionellen Fraktionierung gelöster HS und ihrer Spezies eine tragende Rolle. Hierzu dienten bisher eine Reihe von Trennphasen mit unterschiedlichen Trennmechanismen, wie in Tabelle 4 kurz dargestellt wird.

**Tab. 4:** Chromatographische Verfahren für HS und deren Trennprinzipien

Stationäre Phase	Trennprinzip	Abkürzung	Literatur
Umkehrphasen, z.B. C-18, C-Phenyl	Hydrophobe Wechselwirkung	RPLC	[81]
Anionenaustauscher, z.B. DEAE-Cellulose	Ionenaustausch	AnEx-LC	[82]
Metallbeladene Ionenaustauscher, z.B. Hyphan-Fe(III)	Immobilisierte Metallchelate mit Affinität zu HS	IMAC	[83]
Gelpermeationsphasen	Trennung nach Molekülgröße	GPC	[15]

### ***Umkehrphasenchromatographie (RPC)***

Die RPC wurde bereits in einer Reihe von Arbeiten zur HS-Fraktionierung genutzt [81,84,85]. Das Trennverfahren basiert auf der unterschiedlich ausgeprägten Affinität der HS-Moleküle zu chromatographischen Trennphasen, die mit unpolaren Alkylketten von 4 bis 18 Kohlenstoffatomen, z.B. RPC-18, substituiert sind. Als mobile Phase wird ein polares Lösungsmittel, meist Wasser, Methanol oder Acetonitril, benutzt. Unpolare HS-Strukturen haben eine größere Wechselwirkung mit der stationären Phase als polare, sodaß letztere als erstes eluiert werden. Bei der RPC von HS besteht jedoch das Problem, daß diese irreversibel an der stationären Phase adsorbiert werden. Um derartige Verluste zu minimieren, benutzt man häufig wäßrige Puffer, die jedoch das Chromatogramm stark verändern können.

### ***Metallaffinitätschromatographie (MAC)***

Neuerdings konnte auch die MAC erfolgreich zur HS-Fraktionierung genutzt werden. Das Trennverfahren basiert auf der unterschiedlich ausgeprägten Affinität der zu trennenden HS-Moleküle zu bestimmten Metallionen, z.B. Fe(III), die durch Komplexbildung an Chelatliganden der stationären Phase immobilisiert wurden. Zur HS-Elution aus dieser Trennphase können Lösungen mit einem pH-Gradienten oder steigenden Elektroytgehalten oder auch EDTA gewählt werden. Die Fraktionierung basiert nicht auf der Molekülgröße sondern auf dem unterschiedlichen Metallbindungsvermögen der vorliegenden HS-Moleküle. Burba et al. [86] konnten auf diese Weise aquatische HS an Fe(III)-beladener Cellulose auftrennen, wobei die erhaltenen Fraktionen ansteigende Metall-Komplexierungskapazitäten aufwiesen. Eine ähnliche Klassifizierung mittels Niederdruck- und Hochdruck-MAC mit HYPHAN-Fe(III) als Trennphase wurde von Aster ausgeführt [15].

### 3.5.3. Größenklassierung

Eine wesentliche Stoffeigenschaft, mit der sich gelöste HS-Moleküle und ihre Metallspezies unterscheiden lassen, sind ihre stark differierenden Molekülmassen bzw. -größen. So erstrecken sich Molekülmassen-Verteilungen von HS in Gewässern häufig von  $10^3$  bis  $10^6$  g/mol (Dalton). Deshalb spielen Trennverfahren zur Größenklassierung gelöster HS eine zentrale Rolle bei ihrer Charakterisierung.

#### 3.5.3.1. Gelpermeationschromatographie

Die Gelpermeationschromatographie (GPC) ist das konventionelle Referenzverfahren zur Größenfraktionierung von HS und bereits vielfach dafür eingesetzt worden [87]. Die GPC arbeitet nach folgendem Trennprinzip: HS-Moleküle, deren Durchmesser größer als die mittlere Porengröße des Gels ist, werden als erstes eluiert, während kleinere HS-Moleküle in die Poren diffundieren und dadurch eine längere Verweilzeit in der Gel-Säule haben. Das entstandene HS-Chromatogramm wird meist mit einem UV-Detektor erfaßt und mittels Fraktionssammler aufgeteilt. Die Durchführung der GPC ist ohne Zusatz von Puffer bzw. Elektrolyt nur sehr eingeschränkt möglich. Diese können aber den kolloidalen Zustand aquatischer HS deutlich ändern [30]. Ein weiteres Problem ist, daß HS teilweise irreversibel adsorbieren, sodaß die Retentionszeit nicht mehr allein von der Porengröße des Gels bestimmt wird. Durch die irreversible Adsorption gehen erhebliche Probenanteile verloren, die nur durch extreme Elutionsmittel, die jedoch Strukturänderungen hervorrufen, eluiert werden können. Deshalb wurden in jüngster Zeit vermehrt Membran- bzw. Ultrafiltrations-Techniken (UF) zur Größenklassierung von HS genutzt [88,89,90].

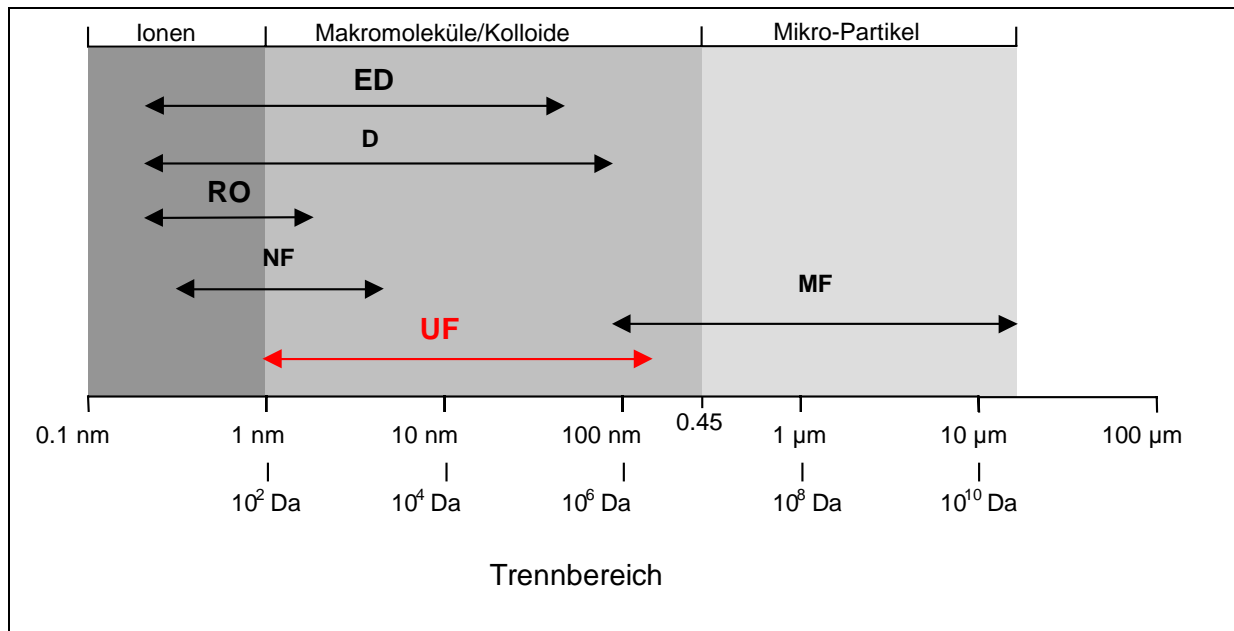
#### 3.5.3.2. Membranfiltration

Die Membranfiltration ist bereits vielfach als Fraktionierungstechnik für aquatische HS eingesetzt worden, wie diesbezüglichen Übersichten zu entnehmen ist [91]. Die Qualität dieser HS-Fraktionierungen erwies sich als stark abhängig von den genutzten Membranen [91].

#### **Membranen**

Prinzipiell versteht man unter einer Membran eine partiell durchlässige Schranke zwischen zwei Phasen. Membranen erlauben eine eingeschränkte und/oder regulierte Passage von einer oder mehreren Spezies zwischen den vorliegenden Phasen. Die verfügbaren Membranen können verschiedene Eigenschaften aufweisen, wie z.B. natürlich oder synthetisch, porös oder nicht porös, adsorptiv oder diffusiv, osmotisch, ionenaustauschfähig oder inert, die sich unterschiedlich für Filtrationsprozesse eignen. Bei der Mikrofiltration (MF), Ultrafiltration (UF), Nanofiltration (NF) und umgekehrten Osmose (RO) gelöster Makromoleküle nimmt man den hydraulischen Druck zu Hilfe, um den Transportprozeß zu

beschleunigen. Bei der Dialyse (D) hingegen erfolgt die Trennung durch Diffusion aufgrund der unterschiedlichen Konzentration der permeablen Spezies zu beiden Seiten der Membran. Abbildung 3 zeigt, für welche Größenbereiche aquatischer Inhaltsstoffe Membranverfahren angewendet werden können.



**Abb. 3:** Trennbereiche verschiedener Membranverfahren

Für aquatische Makromoleküle bzw. Kolloide im Größenbereich von 0,45 µm bis 1 nm hat sich die UF als „sanftes“ Fraktionierungsverfahren etabliert [15]. Die Korrelation zwischen molekularer Größe und Molmasse wird bei der UF meist durch Kalibrierung mit globulären Standardmolekülen (z.B. Proteine) abgesichert. Die Tabelle 5 veranschaulicht, welche Gruppen von Wasserinhaltsstoffen mit den verschiedenen Membranmethoden getrennt werden können. So können mittels RO gelöste Substanzen praktisch vollständig vom Lösungsmittel Wasser abgetrennt werden. Bei der UF können große von kleinen Molekülen durch eine Membran mit bestimmtem n.m.w.cut-off separiert werden. Für die UF von Wasserinhaltsstoffen wurden bisher sehr unterschiedliche Membranmaterialien genutzt [92].



**Tab. 5:** Fraktionierung mit Membranverfahren

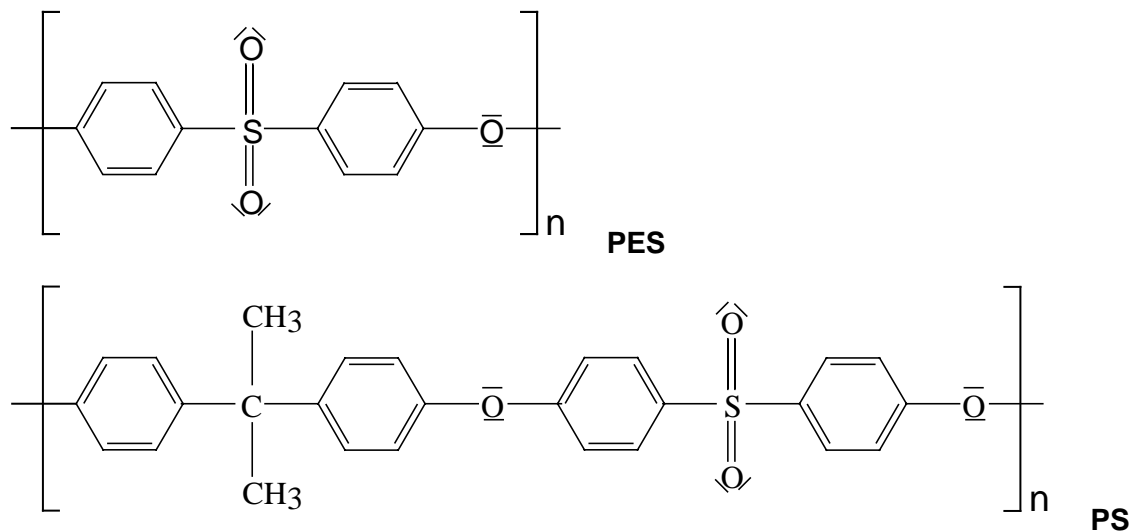
Methode	Retentat	Filtrat
MF	suspendierte Partikel, Wasser	gelöste Substanzen, Wasser
UF	große Moleküle, Wasser	kleine Moleküle, Wasser
NF	kleine Moleküle, dissoziierte Säuren, divalente Ionen, Wasser	undissoziierte Säuren, monovalente Ionen, Wasser
RO	alle gelösten Substanzen	Wasser
D	große Moleküle, Wasser	kleine Moleküle, Wasser
ED	nicht ionisch gelöste Substanzen, Wasser	ionisch gelöste Substanzen, Wasser

Die Tabelle 6 gibt eine Übersicht über die wichtigsten Filtermaterialien, die für die UF verwendet werden können.

**Tab. 6:** Membranmaterialien für die UF

Cellulose (regeneriert)	Polyacrylnitril (PAN)	Polyimid (PI)
Celluloseacetat (CA)	Polyvinylalkohol (PVA)	Polysulfon (PS)
Cellulosetriacetat (CTA)	Polyamid (PA)	Polyethersulfon (PES)

Regenerierte Cellulose sowie Celluloseacetat (CA) sind klassische Materialien für die Membranherstellung. Wichtig sind ihre hydrophilen Eigenschaften, die Herabsetzung von Membranadsorptionseffekten („clogging“-Effekt) und ihre günstigen Kosten. Von Nachteil ist ihr begrenzter pH-Arbeitsbereich und ihre mangelnde Resistenz gegenüber Mikroorganismen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Polyethersulfon-Membranen (PES) bevorzugt, die sich bereits in vorausgehenden Arbeiten bewährt haben [15]. Ihr nutzbarer pH-Arbeitsbereich liegt zwischen 1 und 13, was ihre Aufbewahrung und Reinigung stark erleichtert. PES-Membranen sind zudem bis 125 °C beständig und können von Mikroorganismen nicht zerstört werden. PES hat jedoch den Nachteil gegenüber CA, daß es hydrophober ist und stärkere „clogging“-Effekte hervorruft. Die Strukturen von PS und PES sind in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4:** Struktur von PES (OMEGA: Hochleistungsflachmembran) und PS

Die  $\text{SO}_2$ -Gruppen verleihen dem PES und PS eine hohe chemische Stabilität, weil sie mit Resonanz-Elektronen benachbarter aromatischer Ringe wechselwirken. Der Sauerstoff dieser Gruppen bietet zudem jeweils zwei freie Elektronenpaare an, die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Solvent (Wasser) und Membran ermöglichen. Die sich wiederholenden Phenyl-Ringe behindern eine Rotation innerhalb des Moleküls. Dies trägt zur mechanischen Stabilität dieser Membranmaterialien bei. Eine Membran besitzt keine einheitliche Porengröße und wird deshalb durch eine s-förmige Permeationskoeffizienten-Kurve charakterisiert. Diese läßt sich durch eine Reihe von Referenz-Makromolekülen, z.B. globulären Proteinen, ermitteln.

### **Konventionelle UF**

In der wasseranalytischen Praxis wird die UF meist in geschlossenen Rührzellen durchgeführt. Eine solche Zelle wird mit einer Membran mit passendem n.m.w.cut-off bestückt. Unter Druck (Inertgas, z.B.  $\text{N}_2$ ) wird die Probe durch diese Membran filtriert. Konventionelle Rührzellen lassen sich nur mit erheblichem Aufwand off-line und on-line in Reihe schalten [93]. Bei dieser Verfahrensweise wird jedes Filtrat, angefangen bei der Membran mit dem größten n.m.w.cut-off und darauf folgend mit Membranen abnehmender n.m.w.cut-offs fraktioniert, wobei nach jeder Fraktionierung noch ein Waschschrift erforderlich ist [94]. Diese Methode hat den Nachteil, daß man eine längere Zeit benötigt, die HS-Probe durch eine Reihe von Ultramembranen zu filtrieren bzw. nachzuwaschen. Der zweite Nachteil ist, daß durch einen relativ starken Filtrationsdruck Konzentrationspolarisations- und „clogging“-Effekte auf der Membranoberfläche begünstigt werden und in einem geschlossenen System gearbeitet werden muß [30].

### **Mehrstufenultrafiltration (MST-UF)**

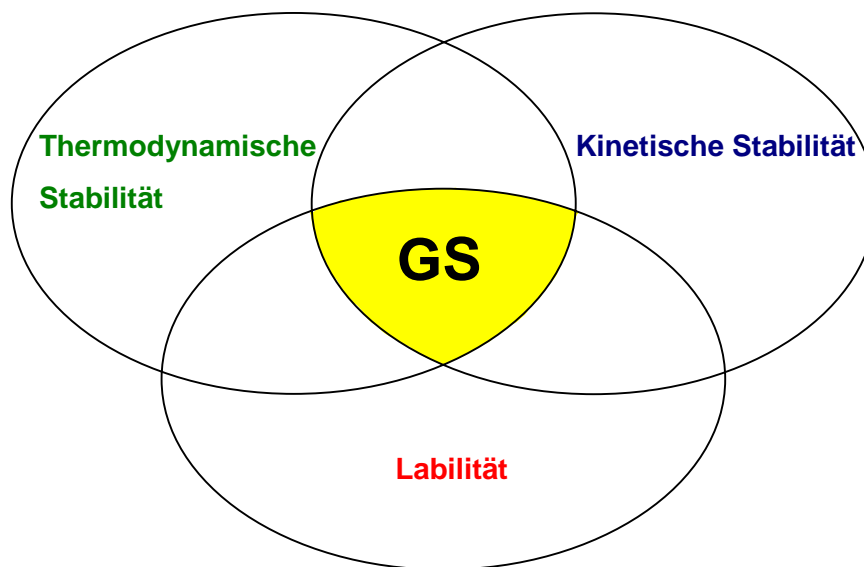
Verglichen mit der konventionellen UF in Membran-Rührzellen stellt die mit Tangentialfluß arbeitende MST-UF eine vorteilhafte Alternative für HS-Fraktionierungen dar. Bei der MST-UF werden gelöste HS sukzessiv im Tangentialfluß über Hochleistungs-Flachmembranen mit definierter Porengröße geleitet. Prinzipiell besteht die „online“-MST-UF aus einer Kaskade von Flachmembranen mit abnehmender Porengröße. Die aufzutrennende HS-Lösung wird kontinuierlich mittels Mehrkanal-Schlauchpumpe über die Membranen der MST-UF gepumpt. Ein schneller Tangentialfluß der Probe verhindert weitgehend Konzentrationpolarisations- und „clogging“-Effekte auf der Membran. HS-Moleküle, die kleiner als der n.m.w.cut-off der Membran sind, passieren diese und werden zu der nächsten geleitet, die größeren verbleiben im Durchflußreservoir. Nach einem Waschschrift werden die einzelnen Fraktionen quantitativ aus den einzelnen Reservoiren gespült.

Der Verlauf einer HS-Trennung mittels MST-UF wird von einer Reihe physikalischer und chemischer Parameter beeinflusst, die eine Verschiebung der charakteristischen Molekülgrößen-Verteilung zur Folge haben können. Diese Parameter sind bereits durch Aster et al. [95] untersucht und optimiert worden. Dieser Arbeit zufolge sind störende Adsorptionseffekte, wie sie z.B. bei der GPC auftreten, bei der MST-UF kaum zu erwarten. Weitere Vorteile sind, daß bei der MST-UF keine Puffer bzw. Elektrolyte erforderlich sind und diese UF-Technik mit relativ wenig Aufwand als analytisches Feldverfahren nutzbar ist. Der Nachteil der Kaskaden-Methode ist der beträchtliche Zeitaufwand. Eine zeitgünstigere Alternative ist möglicherweise die Tangentialfluß-UF im Parallelverfahren. Bei der Parallel-Ultrafiltration (P-UF) werden Fraktionen erhalten, die nach Subtraktion voneinander mit den Ergebnissen der MST-UF vergleichbar sind. Vom Prinzip her ist die P-UF ein einfaches und schnelles Verfahren für die Molekülgrößenfraktionierung von HS vor Ort wie auch *in-situ*. Die hier eingesetzten MST-UF- und P-UF-Techniken werden ausführlich unter Punkt 4.4.1. beschrieben.

### **3.6. Huminstoff/Metall-Wechselwirkungen**

Aufgrund ihres relativ hohen Gehalts an unterschiedlichen funktionellen Gruppen können HS starke Wechselwirkungen mit gelösten Metallionen eingehen und eine Vielzahl von Komplexen bilden. Derartige HS-Metallwechselwirkungen sind für die Metallmobilität in der Umwelt von besonderer Relevanz und bei Transportprozessen, Deposition und (Bio-)Verfügbarkeit von Schwermetallen stets zu berücksichtigen. Die (Bio-)Verfügbarkeit und die mögliche Toxizität der Metalle wird bei ihrer Komplexierung mit HS teilweise stark herabgesetzt, da die freien Metallionen meist eine größere toxische Wirkung ausüben als die in Makromolekülen gebundenen. Sauerstoff-, Stickstoff- und Schwefel-Gruppen in HS kommen als Elektronendonatoren für die Komplexierung von Metallionen in Frage [3]. Der

Sauerstoff ist hauptsächlich in Carboxyl- und phenolischen Gruppen, der Stickstoff in Aminogruppen und der Schwefel in Sulfon- und Thiolgruppen von HS gebunden. Die Metallbindung an aquatische HS ist von vielen Faktoren wie der HS- und Metallkonzentration, der Art des HS und Metallions, vom pH-Wert und der Ionenstärke abhängig [30]. Die „Gesamt-Stabilität“ von HS-Metallspezies setzt sich in verwickelter Weise aus ihrer thermodynamischen und kinetischen Stabilität zusammen, wie Abbildung 5 schematisch verdeutlichen soll. Beide Faktoren sind maßgebend für die sogenannte Labilität von HS-Metallkomplexen, d.h. für deren Dissoziations- und Austauschfähigkeit.



**Abb. 5:** Gesamt-Stabilität (GS) von HS-Metallspezies

Die Metallbindungsformen in HS sind als äußerst komplexe Mischung makromolekularer Metallspezies zu betrachten, die sehr unterschiedlichen Einflußgrößen unterliegen, insbesondere:

- der Art der metallbindenden funktionellen Gruppen (O-, N-, S-haltige Liganden)
- der Komplexierungskapazität der funktionellen Gruppen
- dem Beladungsgrad, der das Verhältnis Beladung/Komplexierungskapazität beschreibt
- möglichen Transformationsprozessen
- Einflüssen eines kolloidalen Systems mit mineralischen Anteilen
- der Molekülgrößen

Diese Parameter sind zu berücksichtigen, wenn HS-Metallspezies und deren Verhalten in aquatischen Systemen umfassend charakterisiert werden sollen [18]. Über die kinetische Stabilität, insbesondere über die wenig stabilen, d.h. labilen HS-Metallspezies und über mögliche Transformationen gibt es bisher nur begrenzte Informationen. Untersuchungen zur

Metallbindung in HS wurden bislang meist an artifiziellen HS-Metallspezies durchgeführt, die durch Komplexierung von Metallionen mit isolierten HS hergestellt wurden. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es hingegen, natürliche HS-Metallspezies schon vor Ort oder wenn möglich *in-situ* zu charakterisieren, um Informationen über ihr Verhalten in den ursprünglichen aquatischen Systemen zu erhalten. Daneben ergab sich die Möglichkeit, bisher kaum bekannte Transformationsprozesse natürlicher HS-Metallspezies bei ihrer Lagerung zu beobachten.

### 3.6.1. Metall-Komplexierungskapazität aquatischer Huminstoffe

Eine wichtige Kenngröße von HS in Bezug auf ihr Metallbindungsvermögen ist ihre Komplexierungskapazität KK. Als KK eines HS wird seine maximale Bindungskapazität gegenüber Metallionen (Me), ausgedrückt in mmol Me/g DOC bzw. mmol Me/g HS, definiert. Dabei wird überwiegend von 1:1-Komplexen bei den betrachteten HS-Metallkomplexen ausgegangen [96]. Die KK eines aquatischen HS bezeichnet operationell die maximale Metallbeladung, die er im gelösten Zustand aufnehmen kann. Wird seine KK überschritten, können aquatische HS in Form von Humaten ausfallen. HS können insbesondere mit Cu(II)-Ionen sehr stabile Komplexe bilden, die analytisch leicht erfaßbar sind. Deshalb wird die KK eines HS vorzugsweise durch Beladung mit Cu(II) charakterisiert. Eine Übersicht über wichtige analytische Methoden zur Bestimmung der Cu(II)-KK gelöster HS gibt die Tabelle 7.

**Tab. 7:** Verschiedene Methoden zur Bestimmung der  $KK_{Cu(II)}$  von HS

analytische Methode	Literatur
anodische Strippingvoltammetrie (ASV)	[97]
differentielle Pulspolarographie (DPP)	[37]
Cu(II)-sensitive Elektrode	[23]
Fluoreszenz-Quenching	[98]
Ultrafiltration / AS	[99]

Teilweise ergaben sich starke Unterschiede in den  $KK_{Cu(II)}$ -Werten, wenn diese mit verschiedenen Methoden ermittelt wurden [37]. Für die meisten aquatischen HS liegt der Wert für die  $KK_{Cu(II)}$  im Bereich von 1 bis 2.5 mmol Cu(II)/g DOC. Die KK ist jedoch nur als eine summarische bzw. operationelle Kenngröße für das Metallbindungsvermögen von HS zu betrachten, die stark abhängig vom untersuchten Metallion ist [100].

Wenn man die KK von HS direkt in Gewässerproben bestimmt, ist diese als konditionelle KK zu betrachten, da die im Gewässer vorliegenden HS von Natur aus schon partiell mit Metallen beladen sind.

### 3.6.2. Charakterisierung von Huminstoff-Metallkomplexen

Ein wichtiger Parameter zur Charakterisierung von HS-Metallkomplexen ist die Bestimmung ihrer thermodynamischen Stabilität. Wie schon erwähnt, setzt sich die „Gesamt-Stabilität“ von HS-Metallspezies in verwickelter Weise aus der thermodynamischen sowie der kinetischen Stabilität zusammen. Die thermodynamische Stabilität von Metallspezies ist ein Maß dafür, inwieweit diese unter bestimmten Bedingungen aus ihren Ausgangsstoffen gebildet bzw. gespalten werden können, wenn sich das System im Gleichgewicht befindet. Die kinetische Stabilität von Metallspezies bezeichnet darüber hinaus die Geschwindigkeit ihrer Umwandlung, die bei austauschträgen Metallionen wie z.B. Cr(III) sehr langsam verlaufen können [101]. Gegen Dissoziation bzw. Metallaustausch kinetisch weniger stabile Metallspezies werden als labil bezeichnet [102].

Bei Annahme, daß zwischen einer Ligandensorte (L) im HS und einem Metall (Me) fast ausschließlich einfache 1:1-Komplexe MeL gebildet werden [103], ergibt sich folgendes thermodynamische Gleichgewicht (10):



Für die betrachteten Metallkomplexe MeL ergibt sich als thermodynamische Gleichgewichtskonstante  $K$ :

$$K = \frac{[\text{MeL}]}{[\text{Me}] \cdot [\text{L}]} \quad (11)$$

Diese einfache Betrachtung gilt jedoch nur für einheitliche funktionelle Gruppen L bzw. Komplexe MeL, beispielsweise wenn Metallionen sich selektiv nur an eine Art von HS-Gruppen binden, wie z.B. Hg(II) an schwefelhaltige Liganden. Da es sich bei HS aber um eine polydisperse Mischung verschiedener Liganden  $L_i$  bzw. Metallkomplexe  $\text{MeL}_i$  handelt, erhält man eine summarische thermodynamische Stabilitätskonstante [104]:

$$\bar{K} = \frac{\prod_{i=1}^n [\text{MeL}_i]}{[\text{Me}] \cdot \prod_{i=1}^n [\text{L}_i]} \quad (12)$$

Hierbei kann man folgende Vereinfachungen durchführen:

- $\prod_{i=1}^n [\text{MeL}_i] = [\text{Me}_b]$ , die Gesamtkonzentration an gebundenem Metall

- $\prod_{i=1}^n [L_i] = ((KK_{Me} \cdot [HS]) - [Me_b])$ , die konditionelle KK dieses HS für das betreffende Metall-ion multipliziert mit der HS-Konzentration  $[HS]$  minus die Gesamtkonzentration an gebundenem Metall

Auf Basis dieser Vereinfachungen ergibt sich eine konditionelle thermodynamische Stabilitätskonstante  $K_i$ :

$$K_i = \frac{[Me_b]}{[Me] \cdot ((KK_{Me} \cdot [HS]) - [Me_b])} \quad (13)$$

$K_i$ -Werte lassen sich durch die Bestimmung von  $KK_{Me}$ ,  $[Me_b]$ ,  $[Me]$  und  $[HS]$  ermitteln. Die so ermittelten  $K_i$ -Werte sind jedoch keine reinen Konstanten, sondern von verschiedenen Parametern abhängig, z.B. von Metallbeladungsgrad, Elektrolytart und -stärke.

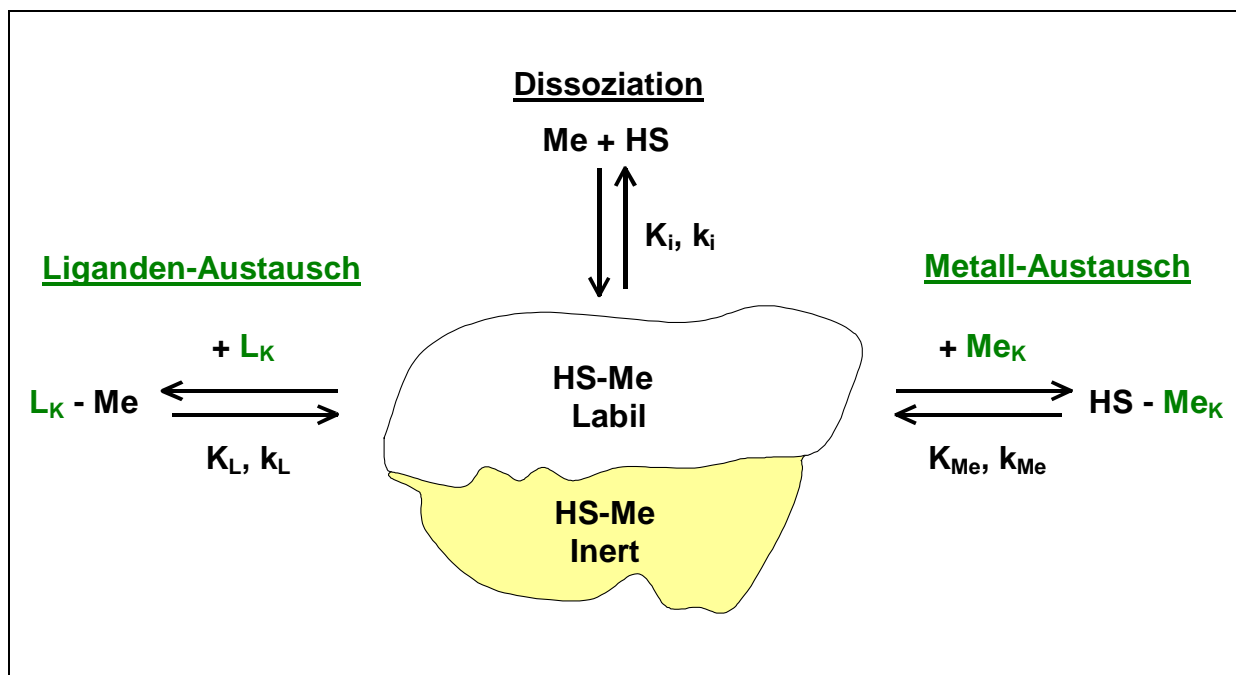
In natürlichen Wasserproben zeigen HS neben ihrer Polyfunktionalität gegenüber Metallen auch physikalische Wechselwirkungen, die in dieser summarischen thermodynamischen Stabilitätskonstanten noch nicht berücksichtigt sind. Hierzu zählen das Verhalten von HS als inhomogene Polyelektrolyte bzw. Kolloide, ihre Tendenz zu inter- und intra-molekularen Aggregationsprozessen sowie ihre Sorption an Feststoffoberflächen. Diese physikalischen Wechselwirkungen sind in natürlichen Wasserproben bzw. HS-Lösungen schwer erfaßbar, sodaß sie nur sehr bedingt in die betrachtete Stabilitätsfunktion für HS-Metallkomplexe aufgenommen werden können. Aus diesem Grund werden HS-Metallkomplexe meist mit vereinfachten Komplexierungsmodellen beschrieben, wie z.B. das diskrete Liganden- oder kontinuierliche Multiliganden-Modell. Das diskrete Liganden-Modell geht von nur wenigen, meist zwei bis drei unterschiedlichen Ligandenformen bzw. Bindungsplätzen aus. Das kontinuierliche Multiliganden-Modell dagegen geht von einer großen Anzahl von leicht unterschiedlichen an der Metallbindung beteiligten Liganden aus, die durch gleichverteilte Stabilitätskonstanten charakterisiert werden können.

Hochmolekulare Komplexe zwischen gelösten HS und Metallionen lassen sich jedoch nicht in eindeutiger Weise durch ihre thermodynamische Stabilität charakterisieren. Das Dissoziationsvermögen bzw. die Labilität von kolloidalen HS-Metallspezies in Gewässern wird in hohem Maß auch durch kinetische Faktoren gesteuert [105]. So kann es sein, daß z.B. Metallionen, die im „inneren“ Bereich von HS-Aggregaten (Kolloiden) gebunden sind, vor ihrer Dissoziation erst nach außen transportiert werden müssen. Deshalb liegt die Metall-Labilität von HS-Metallspezies oft wesentlich niedriger, als es eine rein thermodynamische Betrachtung erwarten ließe.

### 3.6.3. Liganden- bzw. Metall-Austausch an Huminstoff-Metallkomplexen

Metallkomplexe, die sich zwischen gelösten HS und Metallionen bilden, können durch eine Reihe (elektro-)chemischer und spektroskopischer Methoden, z.B. ISE, metallselektive Reagenzien, Chelationenaustauscher, Fluoreszenz-Quenching oder Metall-NMR (z.B.  $^{27}\text{Al}$ ), untersucht werden. Bei der Untersuchung labiler/inerter HS-Metallspezies haben sich insbesondere Ionenaustausch-Verfahren bewährt [106].

Die bereits diskutierte Gesamt-Stabilität natürlicher HS-Metallspezies (HS-Me) lässt sich in differenzierender Weise durch Austausch mit stark konkurrierenden Liganden  $L_K$  (z.B. EDTA) wie auch Metallionen  $Me_K$  (z.B.  $\text{Cu(II)}$ ) erfassen. Das nachstehende Reaktionsschema, Abbildung 6, verdeutlicht eine solche Vorgehensweise, die im Rahmen dieser Arbeit zur Vor-Ort-Charakterisierung von natürlichen HS-Metallspezies in DOC-reichen Wasserproben gewählt wurde.



**Abb. 6:** Gesamt-Stabilität von HS, vor Ort charakterisiert mittels Liganden- bzw. Metall-Austausch

Bei diesen Experimenten werden frisch geschöpfte Wasserproben mit stark konkurrierenden Chelatbildnern, z.B. EDTA, bzw. Metallionen, z.B.  $\text{Cu(II)}$ , versetzt.

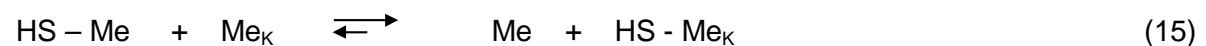
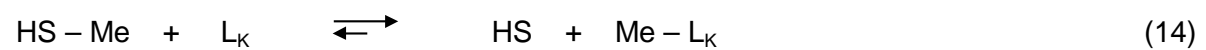
Die durch Austausch entstandenen Spezies lassen sich durch eine zeitkontrollierte, einstufige Tangentialfluß-Ultrafiltration (UF) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit differenzieren. Die Metallanalytik erfolgt im Labor mittels z.B. AAS, ICP-OES und TRFA. Eine derartige Differenzierung ist möglich, da die gebildeten, niedermolekularen Liganden-Komplexe ( $L_K - \text{Me}$ ) bzw. die „freien“ Metallionen ( $\text{Me}_K$ ) eine UF-Membran mit geeignetem cut-off (1 oder 3 kDa) durchdringen, während die höhermolekularen HS-Moleküle und ihre



Spezies zurückgehalten werden. Aus den so charakterisierten Austausch-Kinetiken ( $k_i$ ,  $k_L$  und  $k_{Me}$ ) bzw. Austausch-Gleichgewichten ( $K_i$ ,  $K_L$  und  $K_{Me}$ ) lassen sich differenzierende Aussagen zur kinetischen bzw. thermodynamischen Stabilität der ursprünglichen HS-Me (z.B. Al, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Mg, Mn, Ni, Pb, Zn) ableiten. Aquatische HS-Metallspezies, die durch einen großen Überschuß von  $L_K$  bzw.  $Me_K$  auch nach langer Reaktionszeit nicht erfaßbar sind, werden als inert eingestuft. Die Labilität von HS-Me in Gewässern ist somit eine Art operationeller Summenfunktion aus thermodynamischer und kinetischer Stabilität.

### 3.6.3.1. Austauschkinetik

Den Liganden- und den Metall-Austausch an aquatischen HS-Me kann man durch folgende Reaktionsgleichungen beschreiben:



Allgemein läßt sich folgende Reaktionsgleichung formulieren:



Wenn diese Reaktion insgesamt zweiter Ordnung ist in Bezug auf beide Ausgangssubstanzen (A und B), dann lautet das Geschwindigkeitsgesetz mit Geschwindigkeitskonstante  $k$  wie folgt [107]:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot [A] \cdot [B] \quad (17)$$

Wenn  $[A]_0$  und  $[B]_0$  die Anfangskonzentrationen sind, dann haben diese zum Zeitpunkt  $t$  um den Betrag  $x$  abgenommen und liefern so:

$$-\frac{d[A]}{dt} = k \cdot ([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x) \quad (18)$$

Da

$$-\frac{d[A]}{dt} = \frac{dx}{dt} \quad (19)$$

folgt:

$$\frac{d[x]}{dt} = k \cdot ([A]_0 - x) \cdot ([B]_0 - x) \quad (20)$$

Bei Reaktionsbeginn  $t = 0$  ist  $x = 0$ , sodaß in integraler Schreibweise:

$$k \cdot \int_0^t dt = \int_0^x \frac{dx}{([A_0] - x) \cdot ([B_0] - x)} \quad (21)$$

wird. Hieraus folgt die integrierte Form des Geschwindigkeitsausdrucks für die zweite Ordnung:

$$k \cdot t = \frac{1}{[A_0] - [B_0]} \cdot \ln \left[ \frac{[B_0] \cdot ([A_0] - x)}{[A_0] \cdot ([B_0] - x)} \right] \quad (22)$$

Wenn man die rechte Seite von Gleichung (22) gegen  $t$  aufträgt, ergibt sich eine Gerade mit der Steigung  $k$  als Reaktionsgeschwindigkeitskonstante.

Ist z.B. ein großer Überschuß an Substanz B vorhanden, dann ändert sich die Konzentration  $[B_0]$  während der Reaktion praktisch nicht, sodaß:

$$[B] = [B_0]$$

Dann wird Gleichung (17) mit  $\tilde{k} = k \cdot [B_0]$  zu:

$$-\frac{d[A]}{dt} = \tilde{k} \cdot [A] \quad (23)$$

Dies ist eine Gleichung pseudo-erster Ordnung und läßt sich sehr einfach lösen:

$$\frac{d[A]}{[A]} = -\tilde{k} \cdot dt \quad (24)$$

$$[A] = [A]_0 \cdot e^{-\tilde{k} \cdot t} \quad (25)$$

Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  ist ein sehr anschauliches Maß für die Reaktionsgeschwindigkeit, denn sie gibt die Zeitspanne an, in der die Konzentration eines Reaktanden auf die Hälfte seines Anfangswertes fällt. Diese Halbwertszeit  $t_{1/2}$  erhält man, indem man in Gleichung (25)  $[A]$  durch  $[A]_0/2$  ersetzt:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{\tilde{k}} \quad (26)$$

### 3.6.3.2. Gleichgewichte

Der Liganden- bzw. Metallaustausch an aquatischen HS-Metallspezies, wie in (14) und (15) bereits formuliert, führt zu Gleichgewichten. Diese bestehen formal aus Hin- und Rückreaktion, wie in nachstehender Gleichung (27) allgemein formuliert wird:



Für die Geschwindigkeit von Hin- und Rückreaktion gelten die nachfolgenden Beziehungen:

$$v_1 = k_1 \cdot [A]^a \cdot [B]^b \quad \text{und} \quad v_2 = k_2 \cdot [C]^c \cdot [D]^d \quad (28)$$

mit  $v_1$  bzw.  $v_2$  für die Hin- bzw. Rückreaktionsgeschwindigkeit.

Nach einer bestimmten Zeit stellt sich das Gleichgewicht ein, sodaß:

$$v_1 = v_2 \quad K = \frac{k_1}{k_2} = \frac{[C]^c \cdot [D]^d}{[A]^a \cdot [B]^b} \quad (29)$$

$K$  ist die Gleichgewichtskonstante unter bestimmten Temperatur- und Druckbedingungen nach dem Massenwirkungsgesetz (MWG).

Von besonderem Interesse sind Austauschkonstanten  $K_a$ , mit denen sich die Austauschfähigkeit natürlicher HS-Metallspezies gegenüber stark konkurrierenden Metallionen, z.B. Cu(II), quantifizieren läßt.

## 4. Experimente, Ergebnisse und Diskussion

### 4.1. Probennahme

Die HS in natürlichen Gewässern können sehr unterschiedliche Strukturen, Molekülgrößenverteilungen und Schwermetallbeladungen aufweisen, je nach Genese und Humifizierungsgrad. Bei der Charakterisierung von HS gilt deshalb fast als Regel: Ein HS ist kein HS. Deshalb ist es notwendig, aquatische HS und ihre Metallspezies von verschiedenen Probenahmegebieten zu untersuchen. Zum Vergleich der Ergebnisse benötigt man gut charakterisierte Referenz-HS. Zur Entwicklung und Erprobung der Vor-Ort-Analytik an aquatischen HS dienten zwei typische Braunwasser-Seen bzw. ein Hochmoor-Sickerwasser (Hohlohsee, Venner Moor bzw. Arnsberger Wald).

Dabei sind die Wassertemperatur und der pH-Wert sehr wichtige Einflußgrößen auf die gelösten HS. So steigt bei steigender Wassertemperatur allgemein die Aktivität der Mikroorganismen im Gewässer. Außerdem laufen chemische Transformationen an HS schneller ab. Niederschläge wie auch Trockenheit haben einen deutlichen Einfluß auf die Konzentrationen von HS. Bei niedrigeren pH-Werten im Gewässer sind viele Carboxyl-Gruppen der HS in H-Form, sodaß HS-gebundene Metalle überwiegend dissoziiert sind. Viele wasserchemische Parameter können in ihrer Summe beträchtliche, insbesondere jahreszeitlich bedingte Veränderungen von HS verursachen [4].

#### 4.1.1. Der Hohlohsee

Das Probenahmegebiet Hohlohsee liegt im Nordschwarzwald in der Nähe von Karlsruhe. Es handelt sich um ein unter Naturschutz stehendes Hochmoor, das sich auf 950 m Höhe befindet und weitgehend frei von direkten anthropogenen Belastungen ist. Der stark braun gefärbte See wird fast nur von atmosphärischen Niederschlägen gespeist. Die umgebende Vegetation besteht hauptsächlich aus Nadelbäumen und niedrigen Sträuchern. Der Hohlohsee wird im Rahmen von DFG-ROSIG als Referenzgewässer genutzt.

Bei der Probennahme wurden je 100 L der HS-haltigen Wasserprobe in 1 bis 5 m Entfernung vom Ufer und aus 0.25 m Wassertiefe mit einer Förderpumpe entnommen und in zehn hochgereinigte Polyethylengefäße (10 L) abgefüllt. Die eingesetzte Förderpumpe besaß einen integrierten Grobfilter zur Partikelabtrennung. Unmittelbar nach der Probennahme wurden Temperatur, Leitfähigkeit, Redoxpotential und der pH-Wert der Wasserprobe gemessen; die Ergebnisse sind für die Referenz-HO-Proben in Tabelle 8 zusammengefaßt. Alle drei Wasserproben erwiesen sich als relativ elektrolytarm und schwach sauer. Sie waren durch ein relativ hohes Redoxpotential gekennzeichnet. Die Vor-Ort-Charakterisierung der HS in den Wasserproben erfolgte nach einer konventionellen 0.45 µm-Filtration zur

Abtrennung partikulärer Wasserinhaltsstoffe. Hierzu dienten ebenfalls Polyethersulfon-Flachmembranen (47 mm Durchmesser).

**Tab. 8:** Physikalische und chemische Parameter der Hohlohsee-Wasserproben (HO)

Bezeichnung	HO14	HO16	HO17
Datum	28-07-1997	14-07-1998	02-06-1999
Wassertemperatur	16.8 °C	14.5 °C	22.0 °C
pH-Wert	3.5	3.5	4.2
Leitfähigkeit	45.8 µS/cm	44.5 µS/cm	33.0 µS/cm
Redoxpotential	368 mV	354 mV	324 mV

#### 4.1.2. Das Venner Moor

Das Probenahmegebiet Venner Moor liegt 12 km südwestlich der Stadt Münster (Nordrhein-Westfalen). Es ist ein unter Naturschutz stehendes Moor, das vor ca. 6000 Jahren durch Versumpfung eines Birken- und Kiefernwaldes entstanden ist. Der starke Torfabbau bis in die 50er Jahre hinein führte zu einer zunehmenden Austrocknung des Gebietes, sodaß sich das nasse Hochmoor in ein Heidemoor umgewandelt hat. Die dort befindlichen Braunwasser-Seen werden vorwiegend von Grundwasser bzw. atmosphärischen Niederschlägen gespeist. Die umgebende Vegetation besteht im wesentlichen aus Kiefern und Birken.

Für die Untersuchungen wurden jeweils 100 L Wasserprobe aus dem See geschöpft, vor Ort über einen Filter grob filtriert und in vorgereinigte Polyethylenkanister überführt. Unmittelbar nach der Probenahme wurden Temperatur und pH-Wert jeder Wasserprobe gemessen. Die Ergebnisse für die Venner Moor-Proben (VM) sind in Tabelle 9 zusammengefaßt. Die Vor-Ort-Untersuchungen erfolgten unmittelbar nach einer 0.45 µm-Filtration wie im Fall der HO-Proben. Mobile Messgeräte zur Erfassung von Leitfähigkeit und Redoxpotential waren zur Zeit der Probenahmen nicht verfügbar. Wie aus früheren Messungen von VM-Proben zu ersehen ist, liegt deren Leitfähigkeit etwa doppelt so hoch (ca. 85 µS/cm) und ihr Redoxpotential gleich hoch wie bei den HO-Proben [15].

**Tab. 9:** Physikalische und chemische Parameter der Venner Moor-Wasserproben (VM)

Bezeichnung	VM7	VM8	VM9
Datum	25-05-1998	17-11-1998	21-07-1999
Wassertemperatur	21.2 °C	8.9 °C	20.1 °C
pH-Wert	4.0	4.2	4.1

#### 4.1.3. Der Arnsberger Wald

Das Probenahmegebiet „Stimmstamm“ im Arnsberger Wald ist dem Regierungsbezirk Arnsberg (Nordrhein-Westfalen) zugeordnet. Das dortige Hochmoor liegt auf rund 550 m Höhe und wird von mehreren kleinen, stark braun gefärbten Bächen entwässert. Die umgebende Vegetation besteht hauptsächlich aus Erlen, Birken und anderen Laubbäumen. Für die Untersuchungen wurden je 100 L Wasserprobe entnommen und analog zu den VM-Proben behandelt. Die Meßergebnisse sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

**Tab. 10:** Physikalische und chemische Parameter der Arnsberger Wald-Wasserproben (AW)

Bezeichnung	AW3	AW4
Datum	27-01-1999	04-10-1999
Wassertemperatur	2.9 °C	11.1 °C
pH-Wert	3.9	4.2

#### 4.1.4. Referenz-Huminstoffe

Im Rahmen des DFG-Schwerpunktprogrammes ROSIG wurden allen beteiligten Arbeitsgruppen frisch gewonnene Referenz-HS zur Verfügung gestellt, um die eingesetzten analytischen Methoden und die mit ihnen erhaltenen Ergebnisse überprüfen zu können, wie z.B. die der DOC-Bestimmung. Bei gemeinsamen Probennahmen am Hohlohsee wurden Referenzwasserproben genommen, mit denen die einzelnen Arbeitsgruppen ihre Untersuchungen durchführten. Auf diese Weise konnten die Isolierungs- und Analyse-Verfahren der verschiedenen Arbeitsgruppen überprüft werden. Das Engler-Bunte-Institut (Prof. Dr. F. H. Frimmel) isolierte FA und HA aus den Referenzwasserproben (z.B. HO14 FA, HO14 HA) in Form von Feststoffproben, die für weitere Untersuchungen in den einzelnen Arbeitsgruppen bereitgestellt wurden.

## 4.2. Huminstoff-Isolierung

Natürliche Gewässer weisen in der Regel HS-Gehalte von wenigen bis ungefähr 100 mg/L DOC auf. Für die meisten spektroskopischen Charakterisierungen, wie z.B. NMR, ist deshalb in der Regel eine vorherige Isolierung bzw. Anreicherung der HS aus den Wasserproben erforderlich. Bevorzugte Anreicherungsverfahren sind die Isolierung durch Sorption an unterschiedlichen festen Phasen (Aktivkohle,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{SiO}_2$ , synthetische Harze) [108], sowie Gefriertrocknung [3], Vakuumdestillation (Rotavap) [43] und Ultrafiltration [94].

Die Isolierung ist als kritischer Bearbeitungsschritt zu betrachten, da es dabei oft zu unerwünschten Fraktionierungen bzw. irreversiblen Strukturänderungen in den HS kommen kann. Die Eigenschaften der isolierten HS sind deshalb stark von der gewählten Isolierungsmethode abhängig. In der vorliegenden Arbeit wurde die HS-Isolierung nach der Probenahme sowohl mittels präparativer Ultrafiltration wie auch nach dem konventionellen XAD 8-Verfahren im Labor durchgeführt.

### 4.2.1. XAD 8-Verfahren

Als Standardverfahren für die Isolierung aquatischer HS hat sich deren präparative Sorption an XAD 8 etabliert [17]. Das XAD 8-Harz ist ein makroporöses und mäßig polares Polymer auf Basis von Polyacrylsäureester und wird in Trennsäulen verwendet [109]. Das XAD 8 weist eine ausreichende Kapazität und Selektivität gegenüber gelösten HS auf. Dieses Verfahren wurde 1990 durch die IHSS (International Humic Substances Society) optimiert und standardisiert.

Vor der HS-Abtrennung an XAD 8 wurden jeweils 40 L Originalprobe über ein 0.45  $\mu\text{m}$ -Filter filtriert und dann mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 2 eingestellt, damit die Carboxyl-Gruppen in protonierter Form vorlagen. Nach 24 h wurde die angesäuerte Wasserprobe mit einer peristaltischen Pumpe (3 mL/min Flußrate) auf eine vorgereinigte, mit XAD 8-Harz gefüllte Säule (30 cm Füllhöhe, 2 cm Durchmesser) gegeben, wobei die HS-Moleküle adsorbiert wurden. Die Beladung der Säule mit HS konnte aufgrund ihrer allmählichen Braunfärbung leicht verfolgt werden. Anschließend wurden die adsorbierten HS mit 0.1 M NaOH eluiert. Das so gewonnene HS-Konzentrat wurde mit konzentrierter HCl auf einen pH-Wert von 4 bis 5 gebracht und bei 4 °C dunkel gelagert.

Nachteile des XAD 8-Verfahrens sind eine begrenzte Ausbeute (60-75 %) und mögliche Hydrolyseeffekte an den isolierten HS (Abtrennung bei pH 2.0 und Elution bei pH 13). Ein weiterer Nachteil dieses Verfahrens liegt darin, daß die ursprünglichen HS-Metallspezies zum großen Teil durch saure bzw. alkalische Hydrolyse gespalten werden. So bleiben vom ursprünglichen Hydrokolloid nur noch metallfreie HS übrig. Die aquatischen HS, die durch das XAD 8-Verfahren erhalten wurden, sind im Nachfolgenden mit dem Zusatz XAD 8 gekennzeichnet (z.B. HO14-XAD 8).

## **4.2.2. Präparative Ultrafiltration**

Bereits in vorausgehenden Arbeiten hat sich die präparative Ultrafiltration (UF) als „schonendes“ Anreicherungsverfahren für makromolekulare Metallspezies wie HS-Metallkomplexe erwiesen [15]. Sie hat den Vorteil, daß der ursprüngliche pH-Wert der Wasserprobe nicht verändert wird und somit keine Hydrolyseeffekte an den Metallspezies zu befürchten sind.

Bei der präparativen UF wurden jeweils 60 L Originalprobe nach einer 0.45 µm-Filtration mittels Schlauchpumpe (2 bar) im Kreislauf tangential über eine großflächige Ultrafiltrationsmembran (n.m.w.cut-off = 1 kDa) geführt. Diese Ultrafiltrationsmembran war Bestandteil eines Pellicon-Kassettsystems der Firma Millipore und hatte eine Gesamtfläche von 0.46 m<sup>2</sup>. Die Durchflußrate betrug etwa 40 mL/min. Nach Anreicherung wurde das HS-Konzentrat mit hochreinem Wasser aus dem UF-System herausgespült. Der Nachteil dieses Verfahrens ist, daß HS-Fractionen kleiner als 1 kDa nicht angereichert werden können. Alle HS-Lösungs-konzentrate, die mittels UF erhalten wurden, sind mit dem Zusatz UF gekennzeichnet (z.B. HO14-UF).

## **4.3. Bestimmung gelöster Huminstoffe**

Die Summe aller gelösten organischen Verbindungen in natürlichen Systemen wird in der Wasserchemie operationell als gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) definiert. Aquatische HS bestehen durchschnittlich aus etwa 50 % Kohlenstoff. Deshalb hat sich der DOC-Wert als wichtige Bezugsgröße für die Charakterisierung von aquatischen HS etabliert. In stark HS-haltigen Wasserproben kann der DOC-Wert somit als zuverlässige Bezugsgröße für die HS-Konzentration genutzt werden. Diese Korrelation zwischen DOC und HS-Konzentration diente auch in der vorliegenden Arbeit zur Quantifizierung von HS in Wasserproben und deren Konzentraten.

### **4.3.1. DOC-Bestimmung mittels Kohlenstoffanalysator**

Prinzipiell erfolgte die Bestimmung des DOC nach der Trocknung der Wasserprobe durch Verbrennung im reinen O<sub>2</sub>-Strom (bis 1100 °C), wobei das entstandene CO<sub>2</sub> durch einen NDIR-Detektor erfaßt wurde.

Dank ihrer Nachweisstärke hat sich diese thermographische Methodik bereits in einer vorausgehenden Arbeit, insbesondere bei der Bestimmung von TC („total carbon“), OC („organic carbon“) und EC („elemental carbon“) in Feststoffproben, speziell in Luftstäuben, bewährt [25].



Die Kohlenstoffbestimmungen wurden mit einem Analysator durchgeführt, der als Eigenbau am ISAS konzipiert wurde. Der Aufbau der vollständigen Analyseneinheit ist in Abbildung 7 dargestellt, und in Tabelle 11 sind die Bezeichnungen der Einzelteile aufgeführt. Bei der Kohlenstoffanalyse wird die Probe durch eine Probenschleuse (j) in einem Quarzschiffchen (m,3) auf einem blindwertfrei geglähten Nickelträger (n) in das Quarz-Verbrennungsrohr (k,4) gebracht. Carbonathaltige Wasserproben werden vor der DOC-Bestimmung mit verdünnter HCl auf pH 2 angesäuert. Zunächst wird die wässrige Probe mit Hilfe einer Heizspirale 10 bis 15 Minuten bei max. 80 °C im Quarzrohr im Ar-Strom getrocknet und danach in die Analyseneinheit geschoben. Der Kern der Analyseneinheit besteht aus einem Quarzrohr, welches in zwei Öfen eingebettet ist. In dem ersten Ofen (l) findet die thermische Behandlung und Verbrennung statt (Temperaturbereich: Raumtemperatur-1100°C). Der kontaktfreie, durch einen Halogenstrahler beheizte Spiegel-Ofen (l) ist in Abbildung 7 mit dargestellt. Der zweite Ofen ist ein Pt-Katalysator-Ofen (p+q). Die Trägergase (a) Ar oder O<sub>2</sub> werden durch ein Umschaltventil (d) gewählt und dann durch ein Molekularsieb (f) vorgereinigt. Das Ar wird über eine Oxisorb<sup>®</sup>-Patrone (g) geleitet, um Sauerstoffspuren zu eliminieren. Der Gasvolumenstrom wird über einen regelbaren Flow-Controller (z) auf 12.5 ± 0.5 NL/h O<sub>2</sub> bzw. Ar konstant gehalten und über jeweils für O<sub>2</sub> bzw. Ar geeichte Durchflußmesser (i) kontrolliert. Die Temperatur im Analysenofen wird mittels eines Pt/Rh-Pt-Thermoelements (o,2) zentrisch gemessen.

Bei Verbrennung der getrockneten Proben im O<sub>2</sub>-Strom entstehen CO, CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O, die durch überschüssiges O<sub>2</sub> aus der Verbrennungszone in den Pt-Katalysatorofen (p+q) transportiert werden, wo CO in CO<sub>2</sub> und H-haltige Produkte in H<sub>2</sub>O umgewandelt werden. Der Katalysator besteht aus einem Pt-Netz (p) und wird bei 825 °C betrieben.

Bei der Pyrolyse der Probe im Ar-Strom entstehen Kohlenstoff-Verbindungen, die mit dem Trägergas in den dritten Ofen, den Körbl-Katalysatorofen (v), bei 650 °C geleitet werden, um deren möglichst vollständige Oxidation zu erreichen. Der handelsübliche Körbl-Katalysator besteht zum größten Teil aus AgMnO<sub>4</sub>. Das bei beiden Verfahren entstandene CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O wird durch zwei nicht dispersive Infrarot-Detektoren (CO<sub>2</sub>-NDIR und H<sub>2</sub>O-NDIR) quantifiziert. Über ein 3-Kanal-Interface erfolgt ein Datentransfer (CO<sub>2</sub>-, H<sub>2</sub>O-, Temperatur-Signale) zur Auswertung am PC.

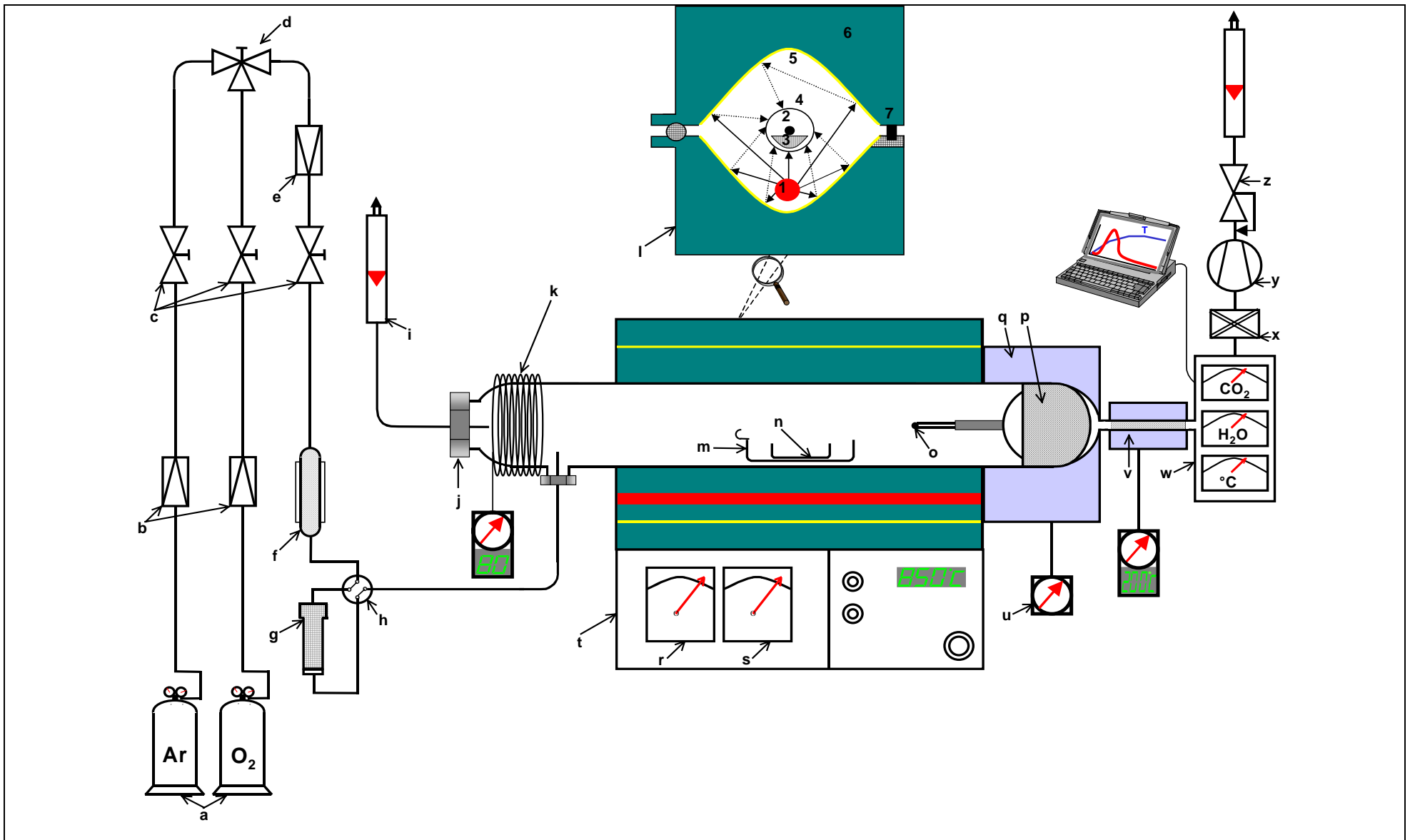


Abb. 7: Schematischer Aufbau des Kohlenstoffanalysators

**Tab. 11:** Bezeichnung der Einzelteile des Kohlenstoffanalysators

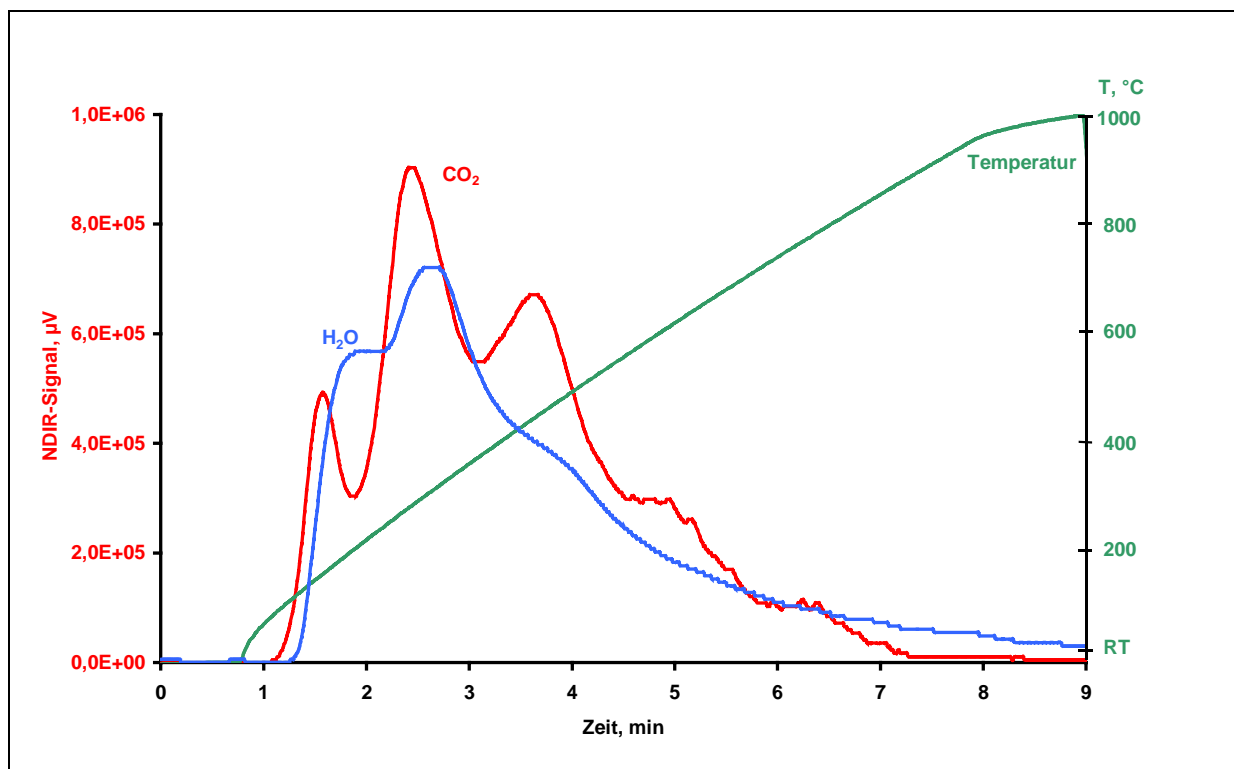
---

1: Stabstrahler IR-05/RP, Ströhlein, Kaarst	e: Niederdruckminderer	p: Pt-Netzkontakt
2: Thermoelement (Pt/Rh-Pt), Heraeus, Hanau	f : Molekularsieb	q: Katalysator-Ofen für Pt, Horst, Bensheim
3: Schiffchen für Proben, Felser, Dortmund	g: Oxysorbpatrone, Messer Griesheim, Krefeld	r: Temp.-anzeige Kat.-Ofen (Pt)
4: Quarz-Verbrennungsrohr, Felser, Dortmund	h: 2 x Zweiwegeventil	s: Temp.-anzeige IR-Ofen
5: Parabol-Reflektor (Au)	i: Gasströmungsmesser 8842, Brooks Instruments, Mannheim	t: Steuereinheit IR-Spiegelofen Binos 1004.2, Fisher-Rosemount, Hanau
6: Wasserkühlung	j: Probenschleuse	u: Katalysator-Ofen Regelung
7: Sicherheitsschalter	k: Quarzrohr+Heizspirale	v: Katalysator-Ofen (Körbl-Kat.)
a: Gasversorgung	l: IR-Spiegelofen (Detail), Ströhlein	w: NDIR-Absorptionsdetektoren, Fisher- Rosemount, Hanau
b: Hochdruckminderer, Druvar, Eppelheim	m: Quarzschiffchen, Felser.	x: Filter (gefüllt mit Quarzwolle)
c: Nadelventile, Druvar, Eppelheim	n: Nickelschiffchen, Goodfellow, Cambridge (GB)	y: Membranpumpe (saugend), Sauer, Wuppertal
d: Umschaltventil	o: Pt/Rh-Pt-Thermoelement	z: Flow-controler (beheizt)

---

Die Kalibrierung des Kohlenstoffanalysators wurde vorzugsweise durch thermische Zersetzung von wasserfreiem  $\text{CaCO}_3$  (p.a.) zwischen 400 und 600 °C vorgenommen, wofür  $\mu\text{g}$ -Mengen von  $\text{CaCO}_3$  in ein ausgeglühtes Ni-Schiffchen eingewogen wurden. Der  $\text{CO}_2$ -NDIR-Detektor ist mit zwei Meßbereichen (500 bzw. 5000 ppm<sub>v</sub>  $\text{CO}_2$ ) ausgestattet, während der  $\text{H}_2\text{O}$ -Kanal nur einen Meßbereich (5000 ppm<sub>v</sub>  $\text{H}_2\text{O}$ ) besitzt. Letzterer kann durch Zersetzung von  $\text{LiSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  kalibriert werden. Die Nachweisgrenze (NWG) für den 500 ppm<sub>v</sub>  $\text{CO}_2$ -Kanal beträgt 245 ng C und wurde aus den operationellen Blindwerten ermittelt. Die Reproduzierbarkeit wurde mit der Probe HO14 (29.9 mg C/L, n=6) bestimmt und beträgt  $\pm 3.0 \%$ .

Allgemein kann man davon ausgehen, daß „einfache“ organische Verbindungen im Temperaturbereich von 250 bis 400 °C und Ruß um die 650 °C oxidiert werden. Anorganische Kohlenstoffverbindungen wie Alkali- und Erdalkalicarbonate zersetzen sich zwischen 500 und 850 °C. Die Verbrennung organischer Verbindungen im  $\text{O}_2$ -Strom nimmt in Abhängigkeit von der Temperatur einen charakteristischen Verlauf. So können aus den resultierenden Pyrogrammen qualitative Rückschlüsse über die Oxidierbarkeit der organischen Verbindungen gezogen werden. Als typisches Beispiel wird in Abbildung 8 ein Pyrogramm vom Referenz-HS HO16-UF (895.5 mg/L DOC) dargestellt, das auf Basis einer Heizrampe von 97 °C/min aufgenommen wurde.



**Abb. 8:** Pyrogramm von HO16-UF im Sauerstoff-Strom, (RT: Raumtemperatur)

Dieses Pyrogramm läßt sich in vier Bereiche mit CO<sub>2</sub>-Maxima bei 180, 290, 450 und 600 °C aufteilen. Praktisch zu vernachlässigen ist der Anteil an anorganischem Kohlenstoff (Carbonat), der etwa zwischen 550 und 850 °C zersetzt wird. Die zur Auswertung genutzte Software ermöglicht es, verschiedene Integrationsbereiche zu erfassen. Das Verfahren funktioniert optimal, wenn man die Verbrennung bei einer niedrigen Heizrampe (50-100 °C/min) durchführt. Alle HS und HS-Fractionen, die im Rahmen dieser Arbeit anfielen, wurden mit der beschriebenen Methodik bestimmt. Die Original-Wasserproben wiesen meist einen DOC-Gehalt zwischen 10 und 110 mg/L auf, die Fraktionen von UF und MST-UF und die XAD 8-Konzentrate Gehalte von wenigen hundert mg bis 4 g/L DOC. Tabelle 12 gibt die DOC-Werte der verschiedenen HS-reichen Wasserproben wieder. Unterschiedlich gewählte Heizrampen von 97, 198 und 267 °C/min hatten praktisch keinen Einfluß auf die Analysenwerte. In Anlehnung an VDI 2465/2 sind mit dem genutzten Analysator auch differenzierende C-Bestimmungen möglich. Hierbei wird die Probe zunächst bei 650 °C in Ar pyrolysiert, um den OC zu erfassen. Nach Abkühlung des Rückstandes wird dieser im O<sub>2</sub>-Strom verbrannt, um den EC zu erfassen. Der im Ar-Strom pyrolysierte Kohlenstoff wird durch einen Oxidationskatalysator in CO<sub>2</sub> umgewandelt.

**Tab. 12:** DOC-Gehalte verschiedener Wasserproben (n=3)

Wasserprobe	VM7	VM8	VM9	HO14	HO16	HO17	AW3	AW4
DOC, mg/L	71.5	83.3	90.4	29.9	25.1	22.9	14.1	13.1
	± 2.7	± 0.1	± 0.8	± 0.6	± 0.6	± 0.4	± 0.1	± 0.3

#### 4.3.2. Vor-Ort-Bestimmung mittels UV/VIS-Spektrometrie

Der Kohlenstoffanalysator ist ein sehr nachweisstarkes Gerät für DOC-Bestimmungen im Labor. Die Vor-Ort-Analytik an kolloidalen organischen Metallspezies erfordert jedoch eine einfachere, möglichst mobile Methode für DOC- bzw. HS-Bestimmungen. Besteht der DOC in den untersuchten Wasserproben hauptsächlich aus gelösten HS, kann hierfür eine mobile, UV/VIS-spektroskopische Methodik genutzt werden. Voraussetzung sind allerdings spektrale Absorptionskoeffizienten (SAK,  $a(\lambda)$ ) der HS, die möglichst geringen natürlichen Schwankungen unterliegen. In der Praxis werden gelöste HS bevorzugt mit ihren SAK  $a(254\text{nm})$  quantifiziert [110].

$$a(\lambda) = \frac{A_\lambda}{d \cdot \text{DOC}}, \quad \left[ \frac{L}{m \cdot \text{mg}} \right], \quad (30)$$

wobei  $A_\lambda$  die Absorbanz bei einer bestimmten Wellenlänge  $\lambda$  ist. Der DOC wird in mg/L und die Schichtdicke der Kuvette  $d$  in m ausgedrückt.

Die Nutzung der UV/VIS-Spektroskopie zur Vor-Ort-Quantifizierung von HS im Gewässer ist stark abhängig von der Schwankungsbreite des SAK, z.B. des  $a(254)$ . Vor einem eventuellen Einsatz der UV/VIS-Spektroskopie für HS-Bestimmungen vor Ort wurden deshalb natürliche Schwankungen der SAK, vorzugsweise  $a(254\text{nm})$  und  $a(436\text{nm})$ , in ausgewählten Gewässern untersucht. Hierzu wurden DOC-Gehalte bzw. UV/VIS-Spektren dieser Gewässer, z.B. des Hohlohsees, bei verschiedenen Probenahmen gemessen. Als typisches Beispiel sind in Tabelle 13 die DOC-Werte bzw. SAK-Werte für den Hohlohsee im Verlauf von fünf Jahren zusammengefasst. Die natürliche Schwankungsbreite des  $a(254\text{nm})$  liegt zwischen 3.12 und 4.09 mit einem Mittelwert von 3.66. Bei Kenntnis dieses mittleren SAK-Wertes können also in unbekanntem Proben desselben Gewässers Vor-Ort-HS-Bestimmungen vorgenommen werden, die mit tragbaren Fehlern behaftet sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden solche Vor-Ort-Bestimmungen an HS mit Hilfe eines neuartigen, mobilen UV/VIS-Spektrometers (Spekol 1200, Analytik Jena GmbH) erfolgreich durchgeführt. So ergab sich im Fall von HO17 eine recht gute Übereinstimmung zwischen Labor- (22.9 mg/L DOC) und vor Ort-Messung (24.9 mg/L DOC).

**Tab. 13:** Natürliche Schwankungen des SAK  $a(\lambda)$  der Hohlohsee Referenzwasserprobe

Huminstoff	DOC*, mg/L	$a(\lambda)$ , $\lambda=254$ nm	$a(\lambda)$ , $\lambda=436$ nm
HO10	21.1	4.09**	0.31**
HO13	23.6	3.98**	0.33**
HO14	29.9	3.12	0.30
HO16	25.1	3.45	0.34
		<b>3.66 ± 0.46</b>	<b>0.32 ± 0.02</b>

\* DOC-Werte im Labor bestimmt mittels Kohlenstoffanalysator

\*\* Gemessen am Engler-Bunte-Institut, Karlsruhe

Mittelwerte der SAK, die für verschiedene HO-, VM- und AW-Proben aus DOC-Bestimmungen und den Absorbanzen  $A(254\text{nm})$  und  $A(436\text{nm})$  ermittelt wurden, sind in Tabelle 14 zusammengestellt.

**Tab. 14:** Mittelwerte des SAK  $a(\lambda)$  von HO-, VM- und AW-Proben

Probe	$a(\lambda)$ , $\lambda=254$ nm	$a(\lambda)$ , $\lambda=436$ nm
HO (n=5)	3.72 ± 0.42	0.32 ± 0.02
VM (n=3)	3.71 ± 0.13	0.39 ± 0.02
AW (n=2)	3.85 ± 0.01	0.30 ± 0.01

## 4.4. Molekülgrößenklassierung mittels Ultrafiltration

### 4.4.1. Vor-Ort-Größenklassierung

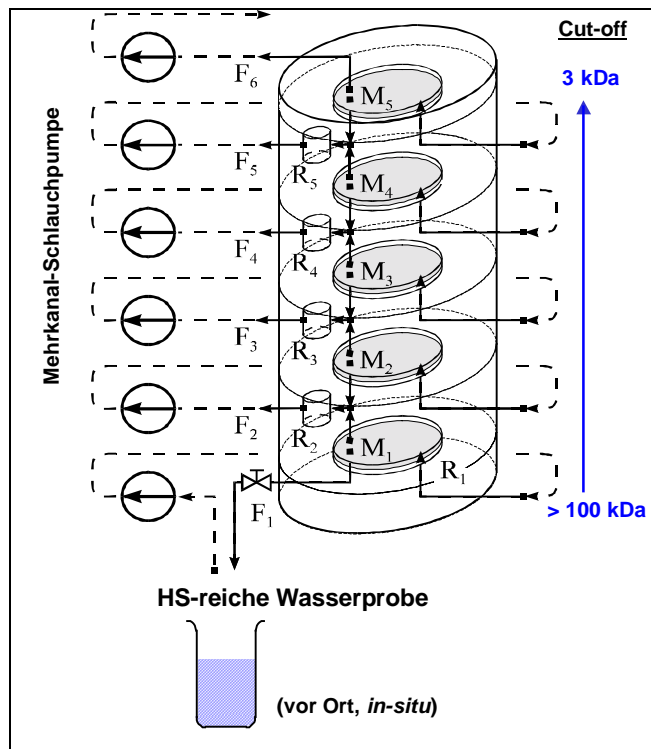
Wie schon in Punkt 3.5.3. erläutert, ist die UF eine ausgesprochen schonende Methodik, um HS und ihre Metallspezies in Gewässerproben nach ihren Molekülgrößen zu fraktionieren. Eine solche Vor-Ort-Klassierung erscheint notwendig, wenn die zu untersuchenden Hydrokolloide raschen Größenveränderungen unterliegen. Die Größenklassierungen aquatischer HS und ihrer Metallspezies wurden in der vorliegenden Arbeit im Kaskaden- wie auch im Parallelverfahren durchgeführt.

#### 4.4.1.1. Mehrstufen-Ultrafiltration (Kaskadenverfahren)

Der apparative Aufbau der mobilen Mehrstufen-Ultrafiltrations-Einheit (MST-UF), die in Kooperation zwischen dem Vernadsky Institut in Moskau und dem ISAS [111] entwickelt und im Rahmen dieser Arbeit für den Vor-Ort-Einsatz optimiert wurde, ist in Abbildung 9 dargestellt.

In der Apparatur sind fünf Membranen abnehmender Porengröße (z.B.  $M_1$ : 100,  $M_2$ : 50,  $M_3$ : 10,  $M_4$ : 5,  $M_5$ : 3 kDa) in Kaskade geschaltet (Kaskadenverfahren). Mit Hilfe einer Mehrkanal-Schlauchpumpe wird die zu fraktionierende HS-Lösung (200 mL) im Kreislauf über die erste Membran ( $M_1$ ) gepumpt. HS-Moleküle, deren Durchmesser kleiner als der n.m.w.cut-off der ersten Flachmembran ist, gelangen durch einen Fließkanal auf die zweite Flachmembran ( $M_2$ ) und so weiter. Die HS-Moleküle, die größer sind als die mittlere Porengröße einer bestimmten Flachmembran ( $M_i$ ), gelangen in die entsprechenden Reservoirs ( $R_i$ ). Nach der Trennung erfolgt ein Waschdurchgang mit deionisiertem Wasser und anschließend werden die verschiedenen Fraktionen ( $F_i$ ) aus den verschiedenen Reservoirs herausgespült.

Für HS-Trennungen im „subpartikulären“ Größenbereich von 0.45 bis 0.1  $\mu\text{m}$  wurde eine zweite MST-UF-Zelle mit anderen Trenngrenzen benutzt. Die Flachmembranen hatten einen cut-off von  $M_1$ : 0.45  $\mu\text{m}$ ,  $M_2$ : 0.22  $\mu\text{m}$  und die letzte Trennstufe  $M_3$  bestand aus drei Flachmembrane von 0.10  $\mu\text{m}$  die parallel geschaltet waren. Bei der Vor-Ort-Fraktionierung von HS wurde zunächst eine MST-UF-Trennung im subpartikulären Bereich (0.45-0.1  $\mu\text{m}$ ) und dann eine im molekularen Bereich (100-1 kDa) durchgeführt. Bei Nutzung eines Zwischenreservoirs können beide MST-UF-Einheiten „online“ betrieben werden.



**Abb. 9:** Apparativer Aufbau der MST-UF; F<sub>i</sub>: Fraktion i, R<sub>i</sub>: Reservoir i und M<sub>i</sub>: Membran i

Vor jeder Fraktionierung wurden Zelle und Membranen mit 0.1 N NaOH gereinigt und danach mit deionisiertem Wasser neutral gespült. Während der Fraktionierung entstehen zunehmend Ablagerungen von Makromolekülen auf der Membranoberfläche und in den Poren. Diese Ablagerungen verringern die Fließgeschwindigkeit durch die Membran und reduzieren den effektiven Porendurchmesser, sodaß eine Verfälschung der Größenverteilung auftreten kann. Die Fließgeschwindigkeit ist ein sehr wichtiger Parameter, den man immer kontrollieren muß, denn wenn sie sinkt, muß man die Membran reinigen oder austauschen. Bei unseren Fraktionierungen konnte man drei bis fünf Fraktionierungen mit der gleichen, gereinigten Membran durchführen. Die kommerziellen Membranen (Flachmembranen OMEGA, Polyethersulfon, 47 mm Durchmesser, Firma Pall-Filtron) sind durch einen definierten Porendurchmesser gekennzeichnet, der mit Hilfe einer Reihe von Referenz-Makromolekülen, wie globulären Proteinen, festgelegt wird. Eine Schwierigkeit ist, daß man keine HS-Moleküle für die Kalibrierung benutzen kann, da diese eine Molmassen-Verteilung besitzen. Die verwendeten globulären Proteine besitzen den Nachteil, daß sie eine andere Form aufweisen als die HS-Moleküle. Der Einfluß von pH-Wert, Elektrolyt-Konzentration, Auswaschvolumen und zeitlicher Unterbrechung auf die Fraktionierung wurde von Aster [15] beschrieben.

Vom Prinzip her ist das MST-UF-Gerät eine kompakte mobile Anlage, die einfach durchführbare Vor-Ort- wie auch *in-situ*-Fraktionierungen kolloidaler Wasserinhaltsstoffe ermöglicht. Als Antrieb dient eine tragbare Pumpe und zur Stromversorgung eine



transportable 12 V Autobatterie (65 Ah Kapazität), deren Gleichstrom bedarfsweise auch auf 230 V Wechselspannung transformiert werden kann. Die Vor-Ort-Größenklassierungen der vorliegenden Hydrokolloide wurden mit zwei verschiedenen MST-UF-Zellen (Subpartikulär- und Molekularbereich) in verschiedenen HS-reichen Gewässern durchgeführt. Die so erhaltenen Größenfraktionen wurden im Labor metallanalytisch und molekülspektroskopisch untersucht und die DOC-Werte mittels Kohlenstoffanalysator bestimmt. In Tabelle 15 sind die so erhaltenen Größenfraktionen von verschiedenen Referenzwasserproben zusammengefaßt, die vor Ort mittels MST-UF erhalten wurden. Die Fraktionen im subpartikulären Bereich (0.45-0.1 µm) wurden mit der ersten MST-UF-Einheit erhalten, die makromolekularen Fraktionen mit der zweiten MST-UF-Einheit. Die DOC-Wiederfindungsraten lagen insgesamt zwischen 84 und 96 % (s. Tab. 15). Demnach wurde ein kleiner Teil der HS an den inneren Oberflächen der MST-UF-Einheit adsorbiert. Für alle untersuchten HS war die Fraktion von < 3 kDa die kohlenstoffreichste Fraktion mit einem mittleren DOC-Anteil von ungefähr 50 %. Die DOC-Verteilungen verschiedener Gewässer hinsichtlich der HS-Größenfraktionen sehen relativ ähnlich aus. HS aus dem gleichen Gewässer (z.B. HO16 und HO17) zeigen jedoch teilweise deutliche Unterschiede. Alles in allem lassen sich aquatische HS-Kolloide mittels MST-UF vor Ort schonend und zuverlässig fraktionieren.

Als Nachteil der Vor-Ort-MST-UF ist ihr erheblicher Zeitbedarf (ca. 2 h) anzusehen. Deshalb wurde als einfacheres und schnelleres Alternativ-Verfahren auch eine Parallel-UF makromolekularer Wasserinhaltsstoffe unter Vor-Ort-Bedingungen erprobt.

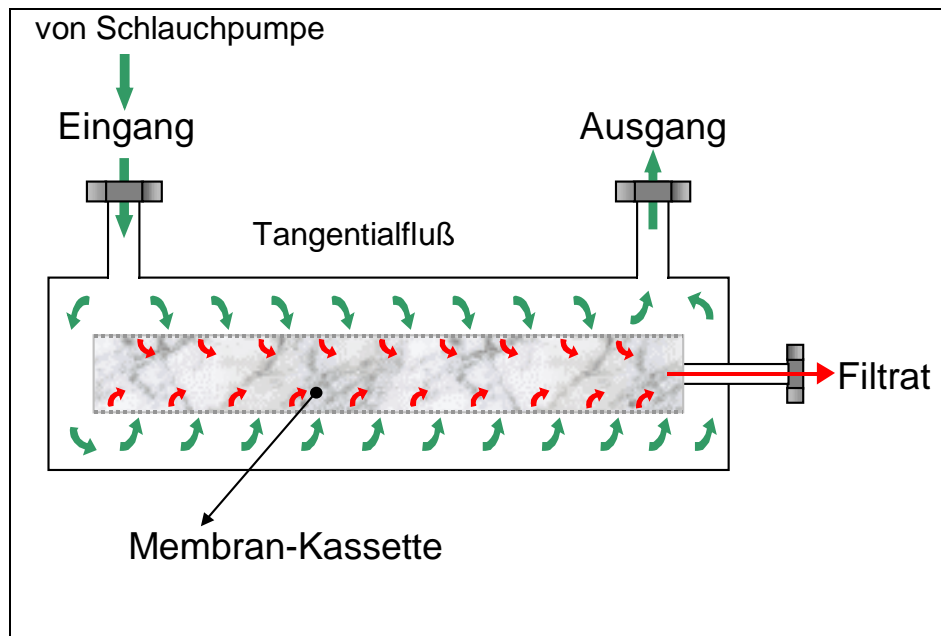
**Tab. 15:** DOC-Anteil (%) der Größenfraktionen in verschiedenen Referenzgewässern, vor Ort klassiert mittels MST-UF. DOC-Wiederfindung über Gesamt-DOC berechnet

Fraktion	HO16	HO17	VM7	VM8	AW3	AW4
0.45 - 0.22 µm	6.5	0.4	11.6	8.5	2.0	0.9
0.22 - 0.10 µm	0.8	0.4	0.3	1.6	1.7	0.6
0.10 µm -100 kDa	7.8	2.7	5.4	6.0	6.7	6.1
100 - 50 kDa	1.1	4.6	6.6	1.6	2.1	4.3
50 - 10 kDa	9.1	4.7	11.1	6.0	9.3	4.9
10 - 5 kDa	9.6	12.3	15.2	11.3	13.4	12.3
5 - 3 kDa	1.2	1.6	6.1	4.9	6.7	6.0
< 3 kDa	50.8	62.3	35.8	44.2	52.8	55.4
DOC-Wiederfindung	86.9	89.0	92.1	84.1	94.7	95.5

#### 4.4.1.2. Parallel-Ultrafiltration (Parallelverfahren)

Für die Vor-Ort-Größenklassierung von Wasserinhaltsstoffen mittels Parallel-Ultrafiltration (P-UF) diente eine Serie von Tangentialfluß-UF-Zellen im Parallelbetrieb.

Der prinzipielle Aufbau der verwendeten Zellen ist in Abbildung 10 gezeigt.



**Abb. 10:** Aufbau einer Tangentialfluß-UF-Zelle für die P-UF

Hierbei wird wie bei der MST-UF eine 400 mL-Probe im Kreislauf mittels Schlauchpumpe (etwa 2 bar) mehrfach tangential über die Membran geführt (siehe grüne Pfeile). Wenn die Moleküle kleiner als der n.m.w.cut-off der Membran sind, können sie die Membran passieren (siehe rote Pfeile). Die Zelle ist kommerziell erhältlich (Crossflow-Filtration, Sartoco<sup>®</sup>-Micro, Firma Sartorius) und mit einer Polyethersulfon-Membran von 50 cm<sup>2</sup> Fläche ausgerüstet. Die Reinigung und Kalibrierung kann wie bei der online-MST-UF erfolgen. Die zu untersuchende Wasserprobe wird vor Ort parallel durch Einzelzellen, die verschiedene n.m.w.cut-offs (5, 10, 50 und 100 kDa) aufweisen, filtriert. Anschließend werden die Inhaltsstoffe der einzelnen Filtrate im Labor gemessen. Durch Subtraktion der für die Filtrate erhaltenen Analysenwerte (s. Seite 44) erhält man das Ergebnis für die jeweils gewünschte Fraktion (z.B. 10-50 kDa). Die P-UF erwies sich als relativ schnelles Verfahren, um Vor-Ort-Größenklassierungen durchzuführen. Der Zeitbedarf der P-UF-Fraktionierungen (5, 10, 50 und 100 kDa) lag bei 30 Minuten. Die erhaltenen Filtrate wurden im Labor metallanalytisch und molekulspektroskopisch untersucht und die DOC-Werte mittels Kohlenstoffanalysator bestimmt.

Tabelle 16 zeigt eine typische Auswertung der P-UF am Beispiel der Wasserprobe AW3. Die in den einzelnen Filtraten gemessenen DOC-Gehalte werden in Relation zum Gesamt-DOC

von AW3 (14.1 mg/L DOC) gesetzt. Aus der Differenz ( $\Delta$  % DOC) der aufeinander folgenden Einzelfiltrate ergibt sich dann der DOC-Anteil der jeweiligen Fraktionen.

**Tab. 16:** Vor-Ort-P-UF von AW3: DOC-Verteilung (%) auf die Fraktionen; Gesamt DOC 14.1 mg/L

Membran, n.m.w.cut-off	DOC*	% DOC	$\Delta$ % DOC	Fraktion
100 kDa	13.1	92.9	13.5 →	100 – 50 kDa
50 kDa	11.2	79.4	25.5 →	50 – 10 kDa
10 kDa	7.6	53.9	7.1 →	10 – 5 kDa
5 kDa	6.6	46.8	46.8 →	< 5 kDa

\*DOC in mg/L

In Tabelle 17 sind die DOC-Verteilungen in den Größenfraktionen verschiedener Gewässerproben zusammengefaßt, die vor Ort mittels P-UF fraktioniert und wie eben beschrieben analysiert wurden. Auch hier verhalten sich die Molekülgrößenfraktionen verschiedener Gewässer in Bezug auf ihren DOC relativ ähnlich. Die Fraktion von < 5 kDa ist mit Ausnahme von HO16 und VM9 die kohlenstoffreichste Fraktion. Bei der P-UF konnten keine Trennzellen mit einem cut-off im subpartikulären Bereich und < 3 kDa verwendet werden, da sie nicht kommerziell erhältlich waren.

**Tab. 17:** Vor-Ort-P-UF an verschiedenen Gewässern: DOC-Verteilung (%) auf die Fraktionen

Fraktion	HO16	HO17	VM8	VM9	AW3	AW4
100 - 50 kDa	14.6	15.5	16.7	25.2	13.5	5.4
50 - 10 kDa	5.8	10.5	11.4	4.8	25.5	3.0
10 - 5 kDa	34.9	36.2	26.5	32.0	7.1	7.6
< 5 kDa	33.9	37.1	38.1	26.7	46.8	65.7
DOC- Wiederfindung	89.2	99.3	92.7	88.7	92.9	81.7

Beim Vergleich der P-UF-Ergebnisse mit denen der MST-UF (s. Tab. 15) ergeben sich starke Unterschiede. So liegen für die P-UF die DOC-Anteile in den höhermolekularen Größenfraktionen signifikant höher als die für die MST-UF. Umgekehrt liegt der Fall bei niedermolekularen Fraktionen (< 5 kDa). Vermutlich spielen Konzentrationpolarisations- und „clogging“-Effekte bei der prinzipiell einstufigen P-UF eine wesentlich größere Rolle als bei der online-MST-UF.

Hierdurch kommt es wahrscheinlich zu erheblichen cut-off-Verschiebungen im Fall der P-UF.

#### **4.4.2. Metallverteilung in Größenfraktionen**

Frühere Untersuchungen mittels MST-UF und Atomspektroskopie an gelagerten HS-Proben haben bereits gezeigt, daß die Metallbeladungen natürlicher HS relativ ungleich auf die Größenfraktionen verteilt sind [15].

Eine wesentliche Frage bei den vorliegenden Vor-Ort-Fraktionierungen an Referenzgewässern war deshalb, ob in natürlichen aquatischen Systemen ähnliche Ungleichverteilungen festzustellen sind. Hierzu wurden die gewonnenen MST-UF-Fractionen im Labor mittels Atomspektrometrie untersucht. Die hierfür verwendeten Methoden der Metallanalytik werden im Folgenden kurz beschrieben.

##### ***Flammen-Atom-Absorptionsspektrometrie (FAAS)***

Die FAAS nutzt das Phänomen der Resonanzabsorption, wobei ein durch ein angeregtes Atom emittiertes Lichtquant von einem nicht angeregten Atom des gleichen Elements absorbiert werden kann. Die zuvor notwendige Überführung von Elementen einer chemischen Verbindung in den atomaren Grundzustand erfolgt durch thermische Dissoziation in einer Acetylen/Luft- bzw. Acetylen/Lachgas-Flamme. Als Primärstrahler dient meistens eine Hohlkathodenlampe oder eine elektrodenlose Entladungslampe, die das betreffende Element im gasförmigen Zustand enthält.

##### ***Graphitrohrofen-Atom-Absorptionsspektrometrie (GFAAS)***

Die GFAAS funktioniert nach dem gleichen Prinzip wie die FAAS, die Atomisierung wird hierbei jedoch in einem stark aufgeheizten Graphitrohrofen erreicht. Um Untergrundabsorptionen zu erkennen bzw. zu kompensieren, wird häufig der Zeeman-Effekt zu Hilfe genommen. Die FAAS und GFAAS werden durch Welz ausführlich beschrieben [112].

##### ***Totalreflexions-Röntgenfluoreszenzanalyse (TRFA)***

Die Röntgenfluoreszenzanalyse [113] läßt die Bestimmung von Analyten auf Basis ihrer charakteristischen Röntgenspektren zu. Sie entstehen durch Anregung mit energiereicher Röntgenstrahlung, die durch Röntgenröhren (z.B. mit Mo-Anode) erzeugt wird. Bei der TRFA trifft die Anregungsstrahlung unter einem sehr flachen Winkel ( $0.1^\circ$ ) auf die Probe, die auf einem optisch glatten Probenträger (Quarz oder Plexiglas) deponiert ist, sodaß der Strahl total reflektiert wird. Der Si(Li)-Halbleiterdetektor befindet sich im  $90^\circ$ -Winkel gegenüber dem Probenträger und kann so die Fluoreszenzstrahlung praktisch ohne gestreute Anregungsstrahlung detektieren. Es ist eine nachweisstarke Multielement-Bestimmungsmethode für Elemente mit einer Ordnungszahl größer als 11 bis herunter in den pg-Bereich [114]. Die TRFA hat den Vorteil, daß man mit einem geeigneten internen Standard (z.B. Ga oder Ge) und kleinen Probenmengen (20  $\mu$ L) arbeiten kann.

### **Induktiv-gekoppeltes-Plasma/Optische-Emissions-Spektrometrie (ICP-OES)**

In der OES [115] werden Spektren detektiert und analysiert, die von angeregten Atomen oder Ionen durch spontane Emission elektromagnetischer Strahlung beim Übergang von einem Zustand höherer Energie in einen solchen geringerer Energie ausgesendet werden, wobei das Plancksche Gesetz befolgt wird. Die Wellenlängen des emittierten Lichtes sind charakteristisch für die in der angeregten Probe enthaltenen Elemente. Auf der Proportionalität zwischen Intensität einer Emissionslinie und Konzentration des Analyten beruht die Voraussetzung für die Durchführbarkeit quantitativer Analysen. Die heutzutage am weitesten verbreitete Anregungsquelle für die OES ist das ICP. Das ICP ist ein bei Atmosphärendruck betriebenes Hochfrequenz-Plasma und basiert auf dem Prinzip der induktiven Aufheizung eines Gases. Zur Erzeugung des Plasmas strömt das Gas, meist Argon, durch einen Brenner, der in der Spule eines HF-Generators aufgestellt ist. Im Plasma werden die Tröpfchen der zerstäubten flüssigen Probe getrocknet, ihre Verbindungen dissoziiert und die dabei gebildeten freien Atome oder Ionen thermisch angeregt.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Meinhard-Zerstäuber verwendet. Jede Probe wurde drei Wiederholungsmessungen unterworfen, wobei insgesamt 9 mL zerstäubt wurden. Als Detektor diente ein CID-chip (Charge Injection Device), der 512 x 512 Pixel in zweidimensionaler Anordnung besitzt, sodaß innerhalb bestimmter Spektrenausschnitte die Intensitäten mehrerer Linien simultan erfaßt werden konnten.

Für die meisten Experimente konnte ein nachweisstarkes simultanes ICP-OES-Spektrometer (IRIS/AP) benutzt werden. Tabelle 18 gibt die für dieses Spektrometer ermittelten Nachweisgrenzen (NWG) in µg/L wieder, die auf Basis von Gleichung 31 [116] berechnet wurden.

$$x = x_0 + 3 \cdot \sqrt{2} \cdot s_B \quad (31)$$

Hierbei ist  $x_0$  der Mittelwert der Metallkonzentration in einer Reihe von Blindproben und  $s_B$  deren Standardabweichung.

**Tab. 18:** Nachweisgrenzen (µg/L) des eingesetzten ICP-OES-Spektrometers; TJA

Al	21.6	Co	2.0	Fe	2.0	Mn	0.3	Pb	11.5
Ca	0.2	Cr	1.1	K	7.4	Na	13.3	Sr	0.3
Cd	0.6	Cu	2.3	Mg	0.6	Ni	3.0	Zn	2.0

Bei den Blindproben handelte es sich um angesäuertes hochreines MilliporeQ-Wasser (0.1 mol/L HNO<sub>3</sub>, suprapur). Bei der angegebenen HNO<sub>3</sub>-Konzentration können gelöste Metalle stabilisiert und Adsorptionen an den Gefäßwänden minimiert werden. Von ihrer Zusammensetzung her sind aquatische HS als relativ „leichte“ organische Matrix zu betrachten. Bei relativ niedrigen HS-Konzentrationen von < 100 mg/L treten praktisch keine

Analysen-Störungen auf. Zur Kontrolle der ICP-OES-Signale kann eine Ar-Linie genutzt werden: wenn diese an Intensität abnimmt, ist mit einer Matrixstörung zu rechnen, z.B. bei hohen DOC-Werten (> 50 mg/L). Meistens können Direktbestimmungen in HS-haltigen Proben ohne aufwendige Aufschlußprozeduren durchgeführt werden, was auch für die TXRF [117] zutrifft. Metallbestimmungen in HS-haltigen Proben mit der GFAAS erfordern jedoch fast immer den Einsatz eines aufwendigen Standardadditionsverfahrens, da die Atom-Absorptions-Signale im Graphitrohr, je nach Element, schon durch relativ geringe HS-Gehalte verändert werden können [118]. Die GFAAS wurde deshalb nur benutzt, wenn die Konzentration des zu bestimmenden Analyten für die ICP-OES zu gering war.

Mit Hilfe der beschriebenen Methodik, bestehend aus einer Vor-Ort-MST-UF von Referenzwasserproben und nachfolgender Quantifizierung im Labor, wurden die Verteilungen der in den beprobten Gewässern vorliegenden Metalle auf die verschiedenen HS-Fractionen ermittelt. Aus früheren Untersuchungen an größenklassierten HS-Metallkomplexen ist bereits bekannt, daß die Komplexbildungskapazität isolierter aquatischer HS mit deren Molekülgröße abnimmt, wie auch die Verfügbarkeit der Metalle gegenüber EDTA [15]. Über kolloidale Metallspezies in Gewässern gibt es noch keine gesicherten Informationen.

Ein typisches Beispiel für die Größenklassierung von HS und deren Metallbeladung an einem Referenzgewässer ist VM7 (Abb. 11), das nach einer 0.45 µm-Vorfiltration mittels standardisierter MST-UF unter natürlichen Bedingungen, d.h. ohne Puffer- und Elektrolyt-Zusatz vor Ort fraktioniert und im Labor mittels ICP-OES hinsichtlich der einzelnen Fraktionen analysiert wurde. Im subpartikulären Bereich von 0.45-0.1 µm findet man vergleichsweise wenig HS dargestellt als DOC-Anteil. Die Hauptfraktion wird von niedermolekularen HS im Größenbereich < 3 kDa gebildet (35.8 % des DOC). Die Metallbeladungen reichen von 0.1 (z.B. Cu) bis 100 (z.B. Fe) µg Metall/mg DOC. Eine signifikante Anreicherung von Metallen, mit Ausnahme von Ca ist in dem Größenbereich 50-100 kDa zu beobachten. Die Fraktion < 3 kDa enthält nebeneinander „freie“ wie auch an kleine HS-Moleküle gebundene Metallionen. Daneben ist eine gewisse „Abreicherung“ an Al, Fe, Mn und Zn festzustellen. Für die Referenzprobe VM8 ergab sich ein ähnliches Verteilungsbild für HS und deren Metallbeladung. Als weiteres Beispiel ist in Abbildung 12 die HS- und Metallverteilung im Referenzgewässer AW4 dargestellt. Im Vergleich zu VM7 ist in dieser Wasserprobe die Fraktion < 3 kDa (DOC-Anteil 55.4 %) noch dominierender geworden, während der subpartikuläre Bereich (DOC-Anteil 1.5 %) an Bedeutung abgenommen hat. Signifikante Unterschiede ergaben sich insbesondere für Fe und Mn. Die AW3-Wasserprobe führte zu vergleichbaren Ergebnissen. Demnach ist in diesem Gewässer keine wesentliche Jahreszeitabhängigkeit (s. Tab. 10) der HS- und Metallspezies-Verteilung festzustellen.

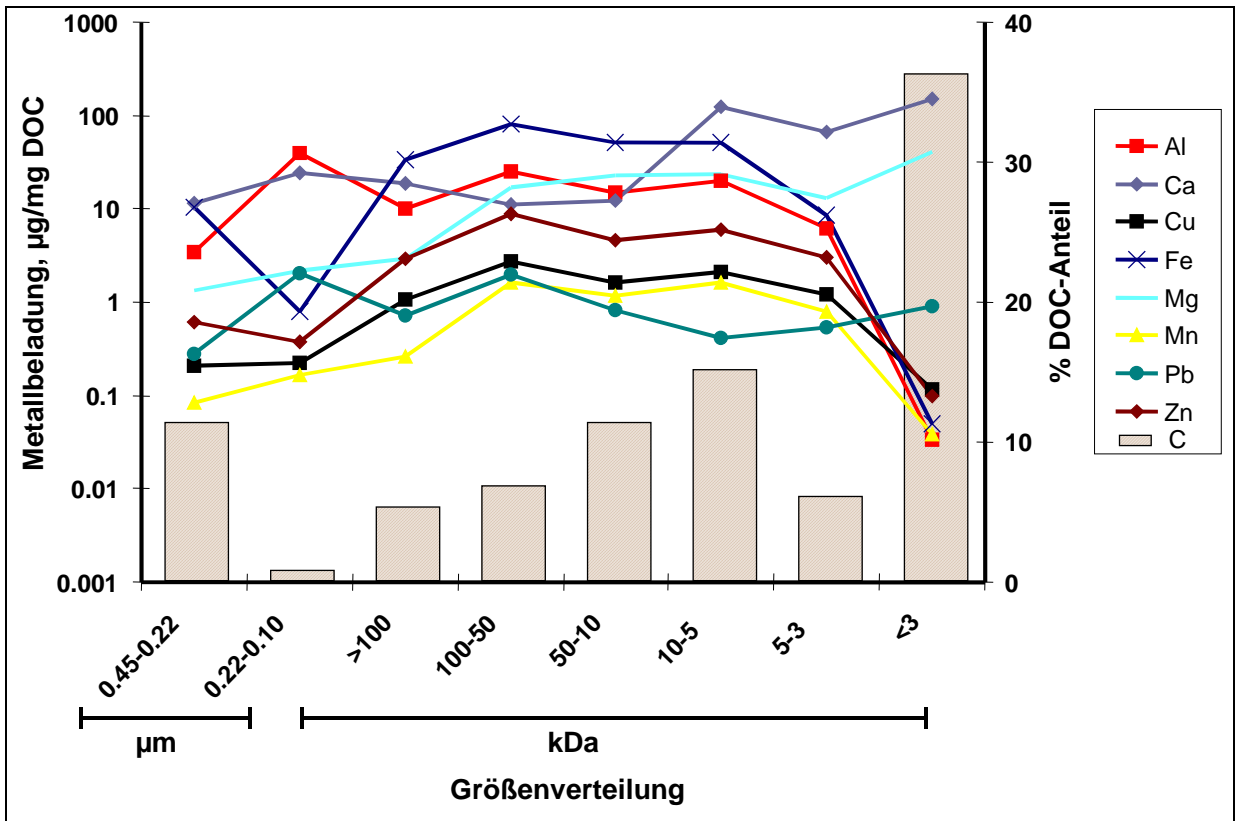


Abb. 11: Vor-Ort-Größenklassierung aquatischer HS und ihrer Metallbeladung (Probe: VM7, 200 mL Probe, pH 4.0, MST-UF)

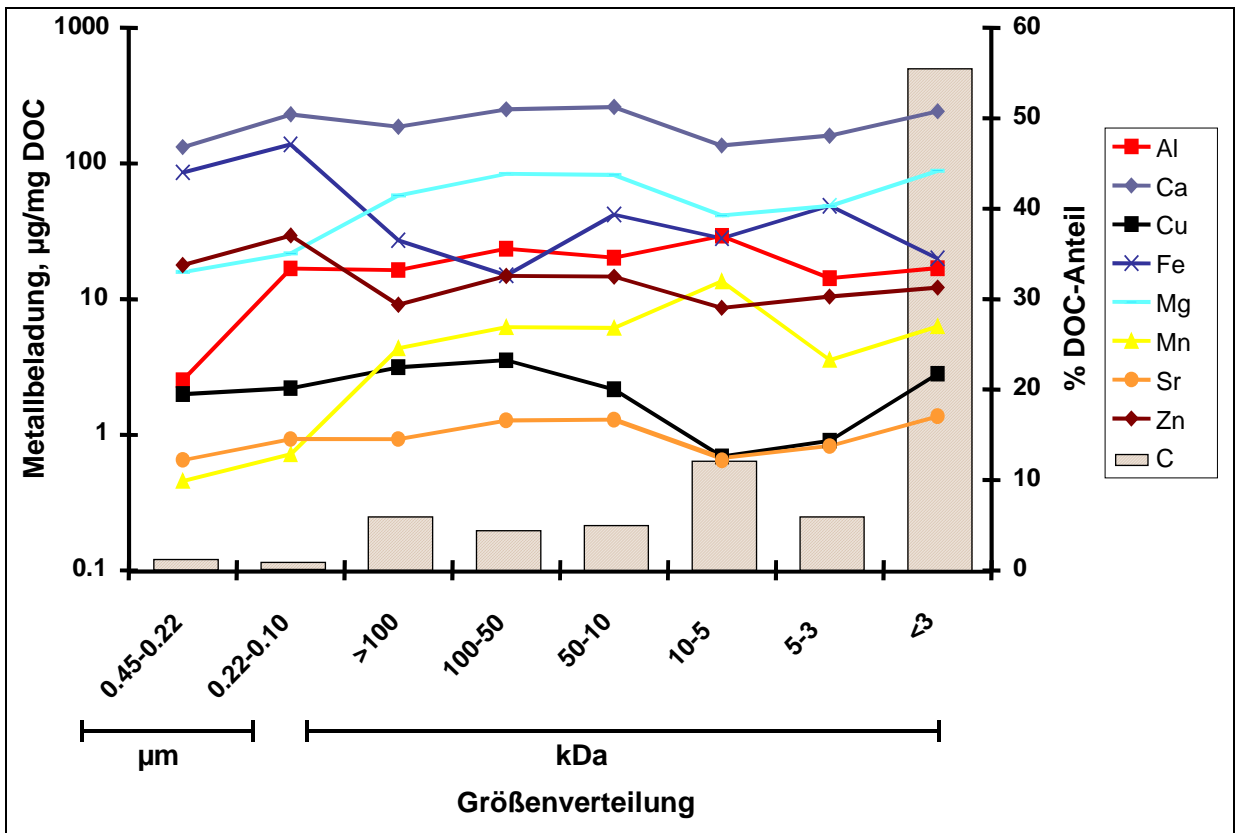


Abb. 12: Vor-Ort-Größenklassierung aquatischer HS und ihrer Metallbeladung (Probe: AW4, 200 mL Probe, pH 4.2, MST-UF)

Als drittes Beispiel ist HO16 aus dem DFG-Referenzgewässer Hohlohsee dargestellt (Abb. 13). Im Vergleich zu den VM- und AW-Proben weist HO16 eine extrem ungleich verteilte natürliche Metallbeladung auf mit einer starken Anreicherung in der subpartikulären Fraktion von 0.22-0.1  $\mu\text{m}$ . Insbesondere für Al und Fe betragen die Beladungsunterschiede zwischen subpartikulären (0.22-0.1  $\mu\text{m}$ ) und niedermolekularen Fraktionen (5-3 kDa) über drei Größenordnungen. Die Fraktion < 3 kDa enthält auch hier den Hauptanteil des DOC (50.8 %).

Deutlich anders verhält sich die Referenzprobe HO17, die etwa ein Jahr später vor Ort charakterisiert wurde (Abb. 14). Die Fraktion < 3 kDa (62.3 % des DOC) ist deutlich stärker vertreten als der subpartikuläre Bereich (0.8 % des DOC). Die natürliche Metallbeladung ist fast gleichmäßig über die verschiedenen Größenfraktionen verteilt.

Einen systematischen Vergleich der größenklassierten Al- und Fe-Spezies in den untersuchten Referenzgewässern, ausgedrückt in  $\mu\text{g}$  Metall/mg DOC, ermöglichen die Abbildungen 15 und 16. Demnach liegen die Al-Gesamtbeladungen der untersuchten VM- und AW-Proben bei 10-20  $\mu\text{g}/\text{mg}$  Gesamt-DOC und verteilen sich relativ gleichmäßig auf die Fraktionen zwischen 0.22  $\mu\text{m}$  und 3 kDa. Die betrachteten HO-Proben fallen hingegen stark unterschiedlich aus: einerseits ergibt sich eine starke Al-Ungleichverteilung über die HO16-Fraktionen, andererseits eine gleichmäßige Verteilung über die HO17-Fraktionen.

Ein dem Al ähnliches Verteilungsmuster ist für die größenklassierten Fe-Spezies in den untersuchten Wasserproben festzustellen (Abb.16).

Die hier vorgestellten Vor-Ort-Untersuchungen an größenklassierten Metallspezies in HS-reichen Gewässern zeigen also auf, daß die gebundenen Metalle überwiegend gleichmäßig auf die subpartikulären und makromolekularen Fraktionen verteilt waren. Starke Metall-Anreicherungen in den subpartikulären Fraktionen waren nur bei wenigen Wasserproben (z.B. HO16) zu beobachten. Signifikante jahreszeitliche Unterschiede (AW3/AW4, VM7/VM8, s. Tab. 9 und 10) in den Metallverteilungen konnten nicht festgestellt werden. Allerdings erlaubt das bisher sehr begrenzte Probenkollektiv aus drei Gewässern noch keine Verallgemeinerung derartiger Aussagen.



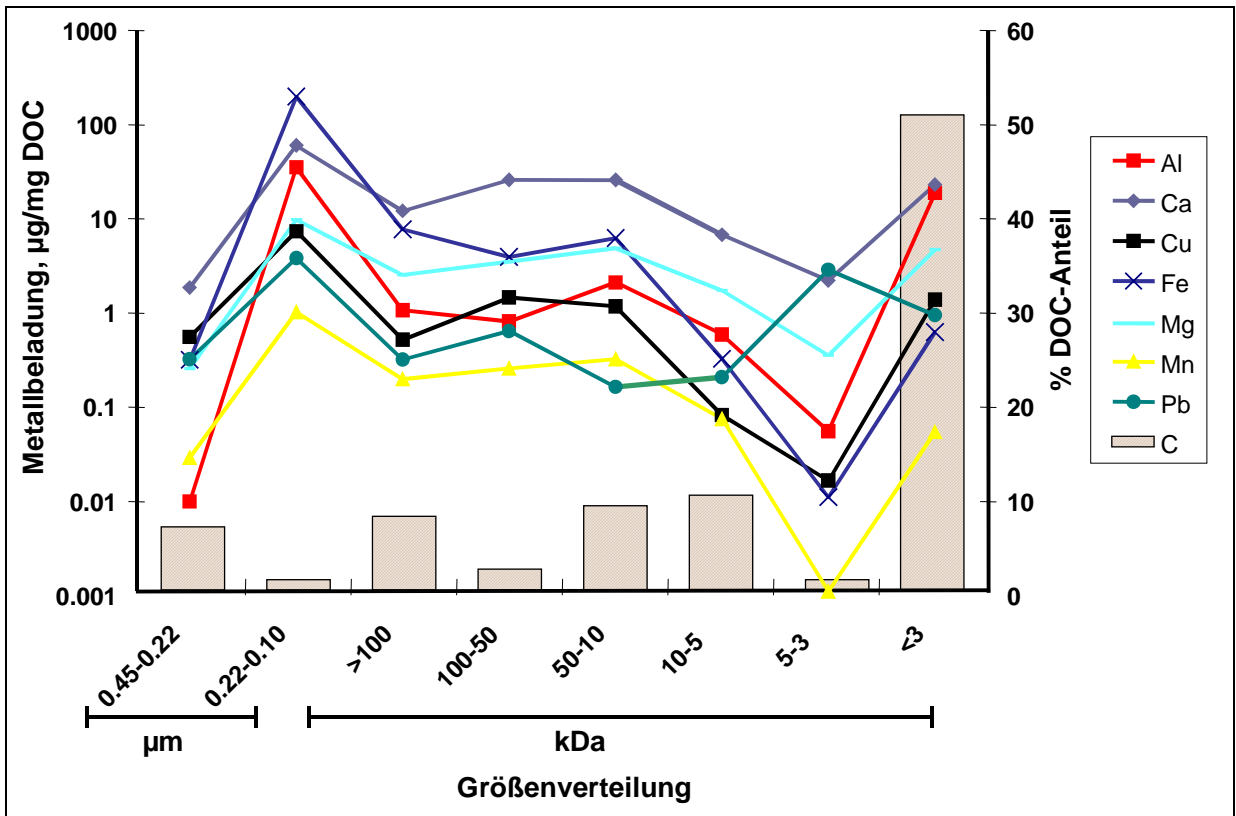


Abb. 13: Vor-Ort-Größenklassierung aquatischer HS und ihrer Metallbeladung (Probe: HO16, 200 mL Probe, pH 3.5, MST-UF)

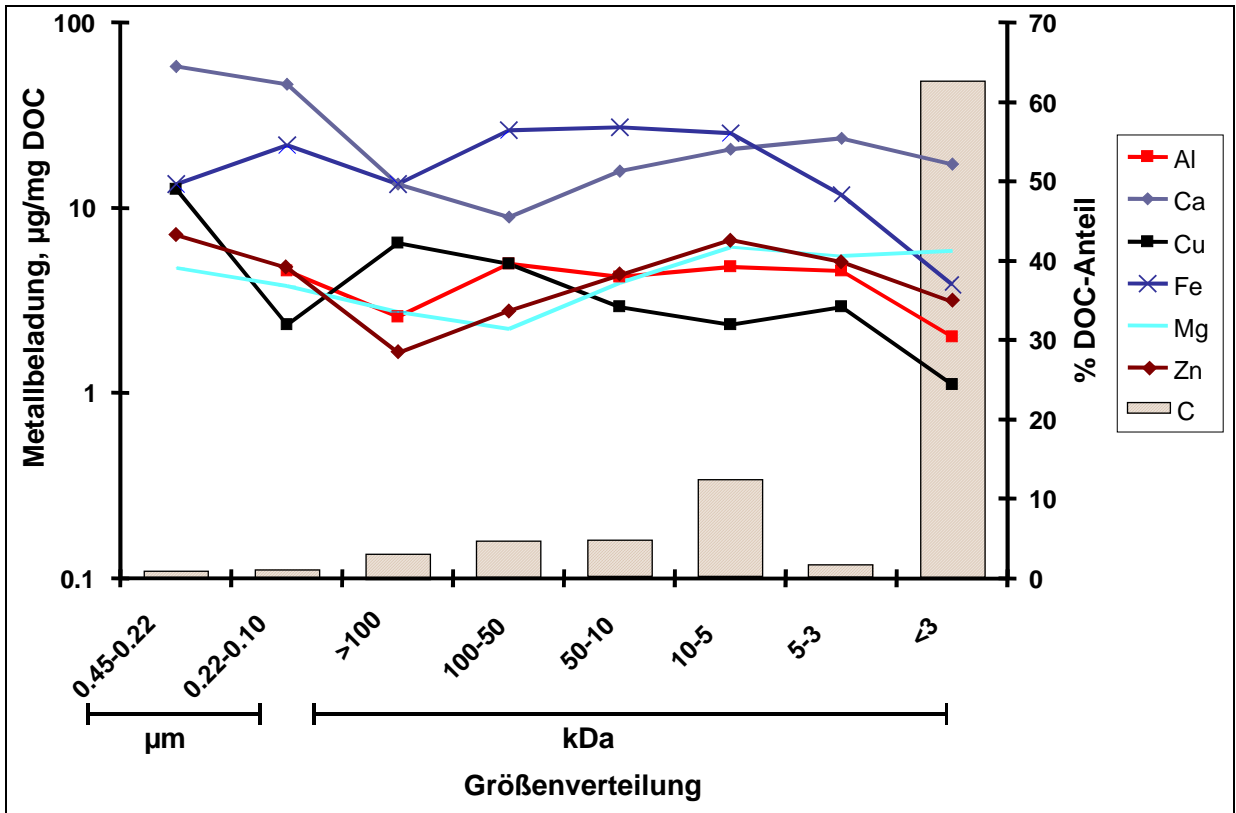


Abb. 14: Vor-Ort-Größenklassierung aquatischer HS und ihrer Metallbeladung (Probe: HO17, 200 mL Probe, pH 4.2, MST-UF)

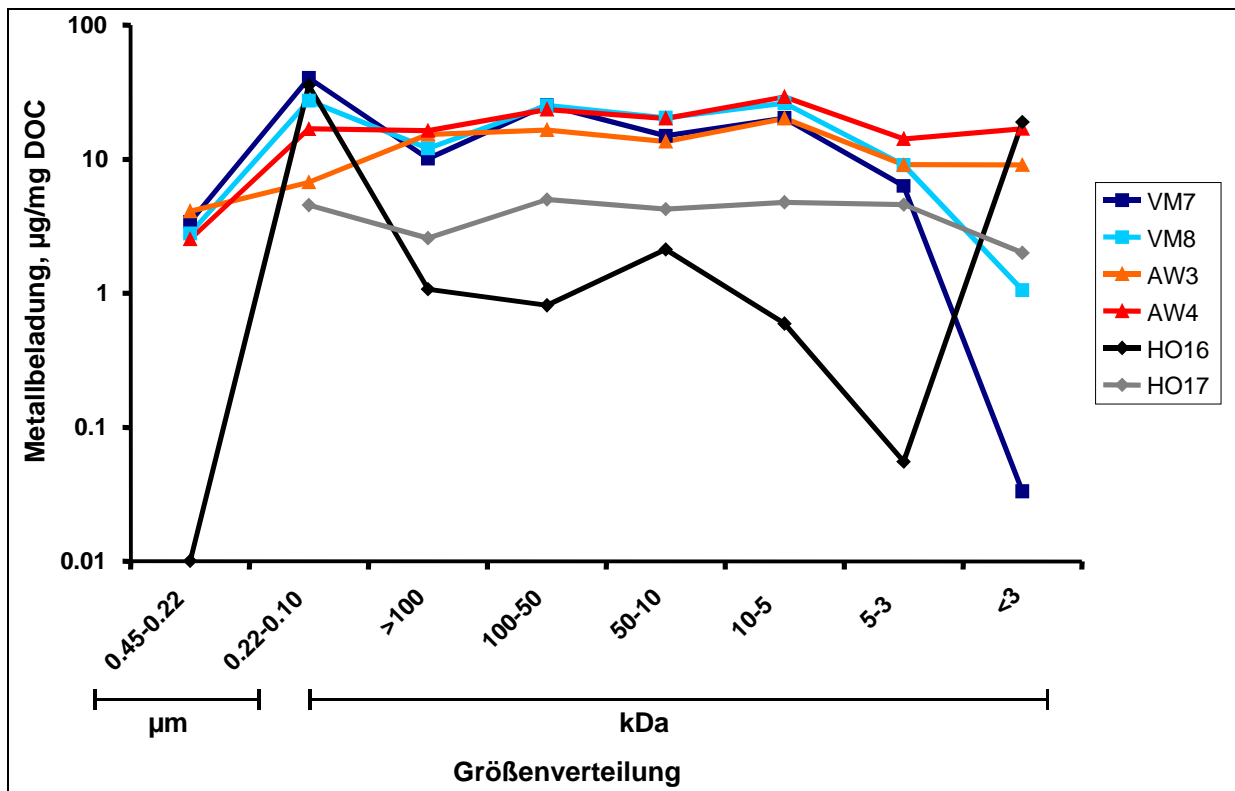


Abb. 15: Vergleich von größenklassierten Al-Beladungen in den untersuchten Referenzgewässern VM, AW und HO

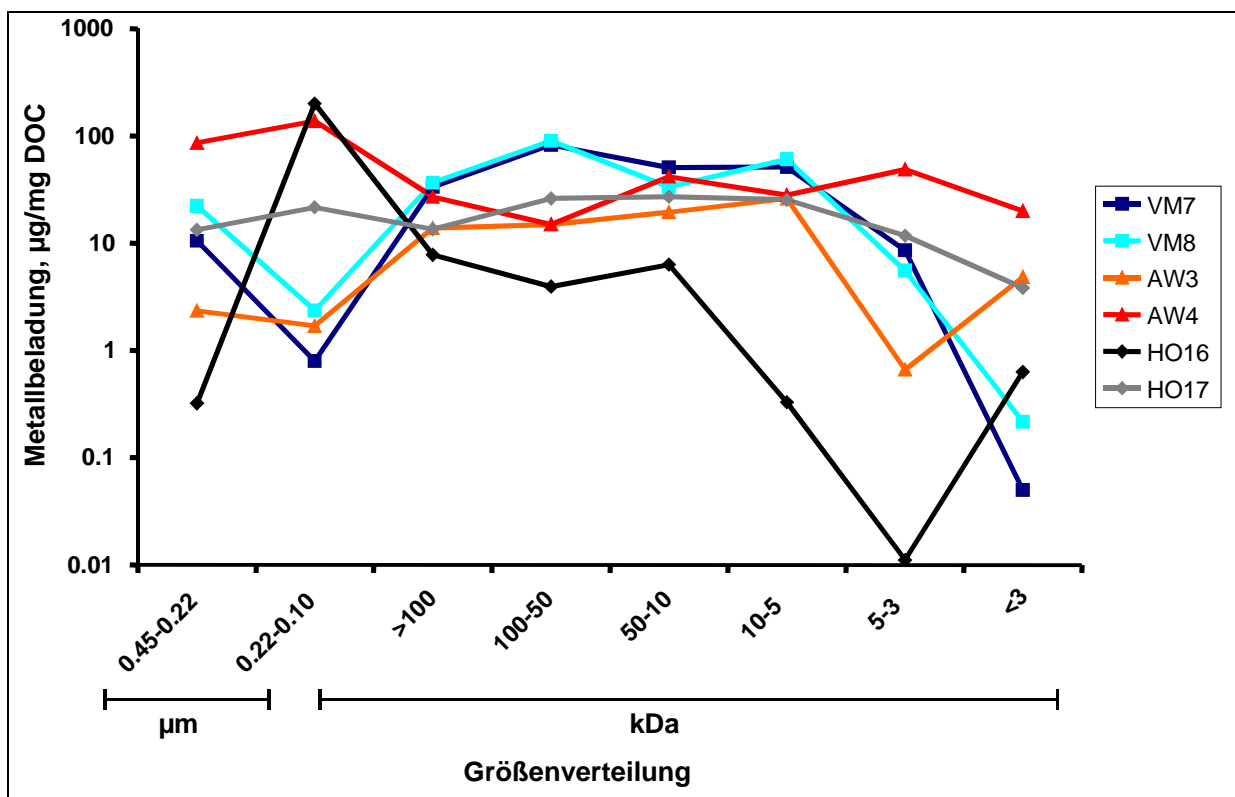


Abb. 16: Vergleich von größenklassierten Fe-Beladungen in den untersuchten Referenzgewässern VM, AW, und HO

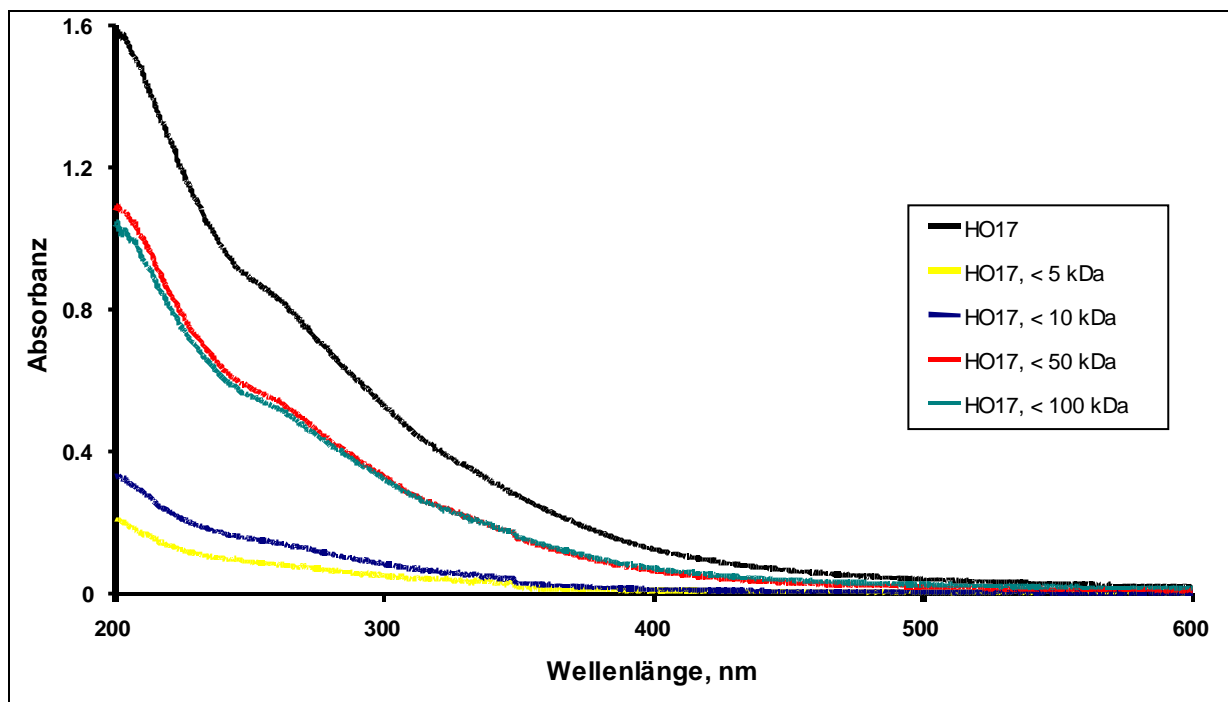
### 4.4.3. Strukturelle Untersuchungen

Eine weitere wichtige Frage bei den vor Ort gewonnenen HS-Fractionen war, wie HS-Strukturelemente in natürlichen aquatischen Systemen auf die verschiedenen Molekülgrößen verteilt sind. Deshalb wurden verschiedene Gewässer-HS vor Ort mittels präparativer MST-UF und P-UF fraktioniert. Deren Analyse wurde vor Ort mittels mobiler UV/VIS-Spektrometrie und im Labor mittels NMR- und 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie durchgeführt.

#### 4.4.3.1. UV/VIS-Spektrometrie

Die Fractionen der Gewässer-HS, die durch P-UF gewonnen worden waren, wurden noch vor Ort mit einem mobilen UV/VIS-Spektrometer (Spekol 1200, Analytik Jena GmbH) im UV/VIS-Bereich (200-600 nm) vermessen. Generell zeigen die UV/VIS-Spektren aquatischer HS einen monoton steigenden Verlauf der Absorbanz vom sichtbaren zum ultravioletten Bereich hin. Der spektrale Absorptionskoeffizient  $a_{254}$  steigt mit abnehmender Molekülgröße der HS. Aus dem Absorbanzverhältnis  $A_{254}/A_{436}$  lässt sich abschätzen, ob die betreffenden HS eher zur FA- oder zur HA-Fraktion zuzuordnen sind [33]. Demnach sind HA generell durch niedrigere  $A_{254}/A_{436}$ -Verhältnisse gekennzeichnet.

Abbildung 17 zeigt als typisches Beispiel die UV/VIS-Spektren der Referenzgewässerprobe HO17 und der aus ihr vor Ort mittels P-UF erhaltenen Größenbereiche. Wie ersichtlich, zeigen HO17 und die daraus gewonnenen Molekülgrößenbereiche einen HS-typischen Verlauf. Aus dem UV/VIS-Spektrum der Gesamtprobe HO17 lässt sich ein Absorbanzverhältnis  $A_{254}/A_{436}$  von 11.2 ableiten, ähnlich wie bei HO14 und HO16 (s.Tab. 19). Etwas niedriger liegt das  $A_{254}/A_{436}$ -Verhältnis in den VM-Proben, etwas höher das der AW-Proben. Wie aus der Literatur ersichtlich, sind  $A_{254}/A_{436}$ -Werte von 10 bis 15 typisch für viele isolierte aquatische HS und weisen auf relativ niedermolekulare FA hin [33].



**Abb. 17:** UV/VIS-Spektren von HO17 und ihren P-UF-Größenbereichen

**Tab. 19:** Absorptionsverhältnisse  $A_{254}/A_{436}$  von verschiedenen Proben

Probe	HO14	HO16	HO17	VM7	VM8	VM9	AW3	AW4
$A_{254}/A_{436}$	10.5	10.3	11.2	9.2	10.4	7.8	13.6	15.6

#### 4.4.3.2. NMR-Spektroskopie

Zu ihrer strukturellen Charakterisierung wurden die vor Ort gewonnenen Fraktionen der Gewässer-HS im Labor mit einem 400 MHz NMR-Spektrometer (JEOL GX 400) vermessen. Für alle  $^1\text{H}$ -NMR-Messungen wurde ein C,H-Dualprobenkopf mit 5 mm Durchmesser verwendet. Die wässrigen HS-Fraktionen wurden zuvor im Rotationsverdampfer bei einer Temperatur von 40 °C unter vermindertem Druck eingedampft. Die so erhaltenen festen Rückstände wurden mit 1 mL  $\text{D}_2\text{O}$  in Lösung gebracht. Als Standard wurde 3-(Trimethylsilyl)propionat-2,2,3,3- $\text{d}_4$  ( $\text{Na}^+$ -Form) benutzt. Die  $^1\text{H}$ -Spektren wurden in einem Frequenzbereich von 5 kHz gemessen und mit 16 K Datenpunkten registriert. Die Pulswinkel wurden anhand des HOD-Signals unmittelbar vor der Aufzeichnung des Gesamtspektrums bestimmt.

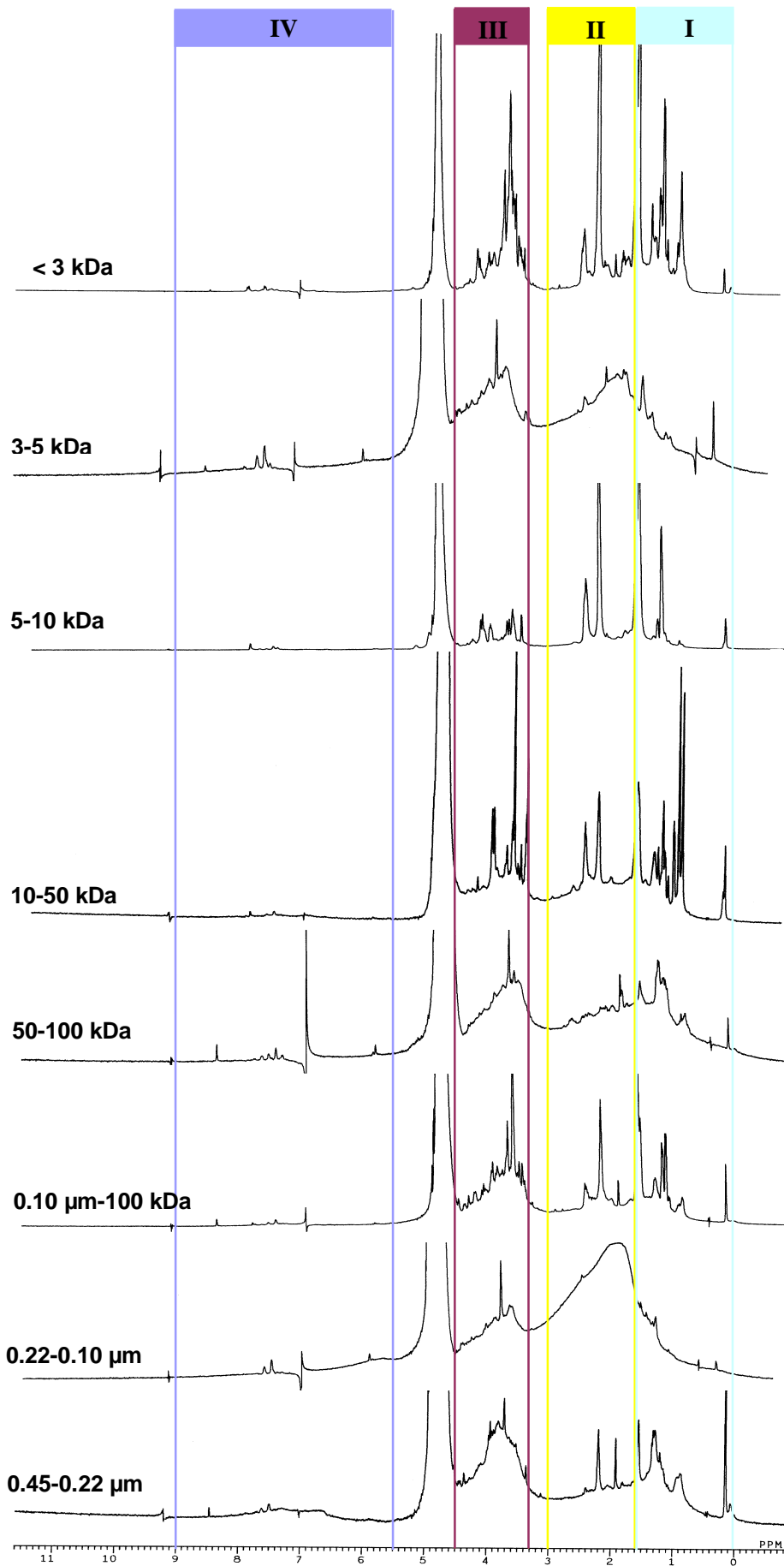
Als typisches Beispiel gibt die Abbildung 18 die so erhaltenen  $^1\text{H}$ -Spektren der HO16-Fraktionen wieder, die mittels MST-UF gewonnen wurden. Diese Spektren lassen sich in vier Integrationsbereiche einteilen, die folgende Strukturelemente beinhalten:

**Bereich I;** 0 – 1.6 ppm;  $\text{CH}_n\text{-C}$  (aliphatisch): Dies ist der chemische Verschiebungsbereich für aliphatische  $\text{CH}_3$ - und  $\text{CH}_2$ -Gruppen. Das Signal bei 0.9 ppm erscheint bei den Fraktionen 10-50 kDa und < 3 kDa deutlich separiert, was man auf die paraffinischen Methylgruppen zurückführen kann. Das Signal bei 1.5 ppm stammt von  $(\text{CH}_2)_n$ -Ketten und nimmt offenbar bei kleineren Molekülgrößen zu.

**Bereich II;** 1.6 – 3.0 ppm;  $\text{CH}_n\text{-CO}$ ,  $\text{CH}_n\text{-Aryl}$ ,  $\text{CH}_n\text{-CN}$ : Das Signal bei 2.2 ppm gehört zu den  $\alpha$ -Kohlenstoffatomen von Fettsäuren und nimmt mit Ausnahme von zwei Fraktionen mit kleiner werdender Molekülgröße zu. Auffallend sind die breiten, nicht aufgelösten Signale in den Fraktionen 0.22-0.10  $\mu\text{m}$  und 3-5 kDa.

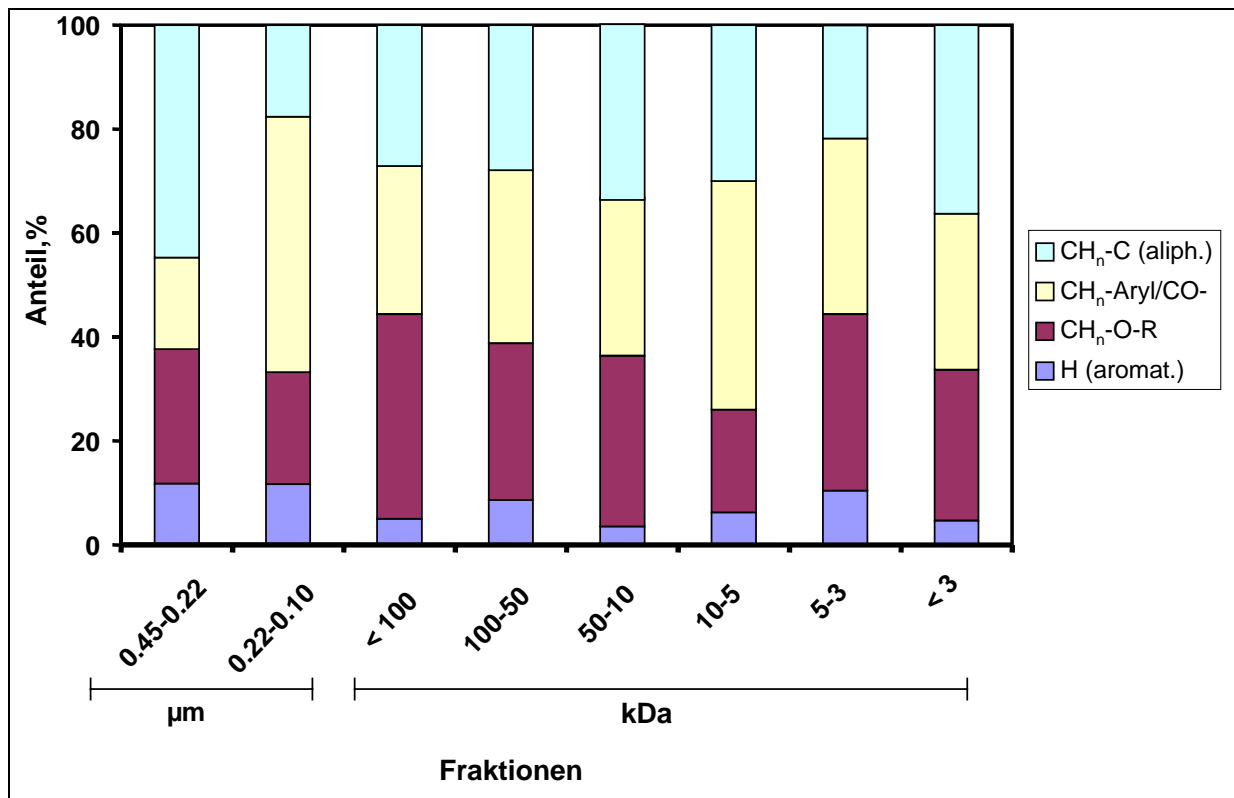
**Bereich III;** 3.3 – 4.5 ppm;  $\text{CH}_n\text{-O-R}$ : Dieser Bereich wird Kohlenhydratstrukturen sowie Alkohol- bzw. Etherstrukturen zugeordnet. Wie ersichtlich, treten sie in praktisch allen Fraktionen deutlich erkennbar auf. Das Singulett bei 3.6 ppm stammt von Malonsäure.

**Bereich IV;** 5.5 – 9.0 ppm: Dieser Bereich wird aromatischen Protonen zugeordnet, die in den Fraktionen kaum vorhanden sind.



**Abb. 18:** <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren der HO16-Größenfraktionen, vor Ort fraktioniert mittels MST-UF (Bereich 4.5 - 5.5: HDO-Signal)

Aus diesen Übersichtsspektren kann man schließen, daß die Fraktionen < 3 kDa und 5-10 kDa zum großen Teil aus Fettsäuren gebildet werden. Die anderen Fraktionen enthalten Kohlenhydrate und Aliphate im Verhältnis von ungefähr eins zu eins. Durch Integration in den vier Signalbereichen ergibt sich eine strukturelle Verteilung des Wasserstoffs in den HS-Fraktionen, wie in Abbildung 19 dargestellt ist. Es gibt Maxima und Minima, aber keine Trends. Offensichtlich sind für HO16 die verschiedenen HS-Partialstrukturen ungleichmäßig auf die Größenfraktionen verteilt. Die gezeigten Ergebnisse (Abb. 19) liegen klar außerhalb der analytischen Fehlergrenzen, da der maximale Integrationsfehler ein Prozent beträgt.



**Abb. 19:** Signalbereiche in den <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren der (MST-UF) Größenfraktionen von HO16

Eine gleichmäßige Protonenverteilung ergibt sich in den größtenklassierten Fraktionen von AW3, wie aus Abbildung 20 zu entnehmen ist. Im subpartikulären Bereich sind jedoch fast keine aromatischen Protonen zu finden. Bemerkenswert ist der relativ hohe Anteil an CH<sub>n</sub>-Aryl/CO-Protonen in der Fraktion 0.22-0.10 µm.

Eindeutige Trends der Partialstrukturen sind auch hier nicht erkennbar. Signalbereiche aus <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren, die von P-UF-Größenbereichen verschiedener Hydrokolloide (AW3, VM8, HO17) aufgenommen wurden, sind in Abbildung 21 dargestellt. Wie ersichtlich ist, sind in den „integralen“, jeweils einseitig nach oben begrenzten Größenbereichen dieser Hydrokolloide die wasserstoffhaltigen Strukturelemente relativ gleichmäßig verteilt, abgesehen von VM8.

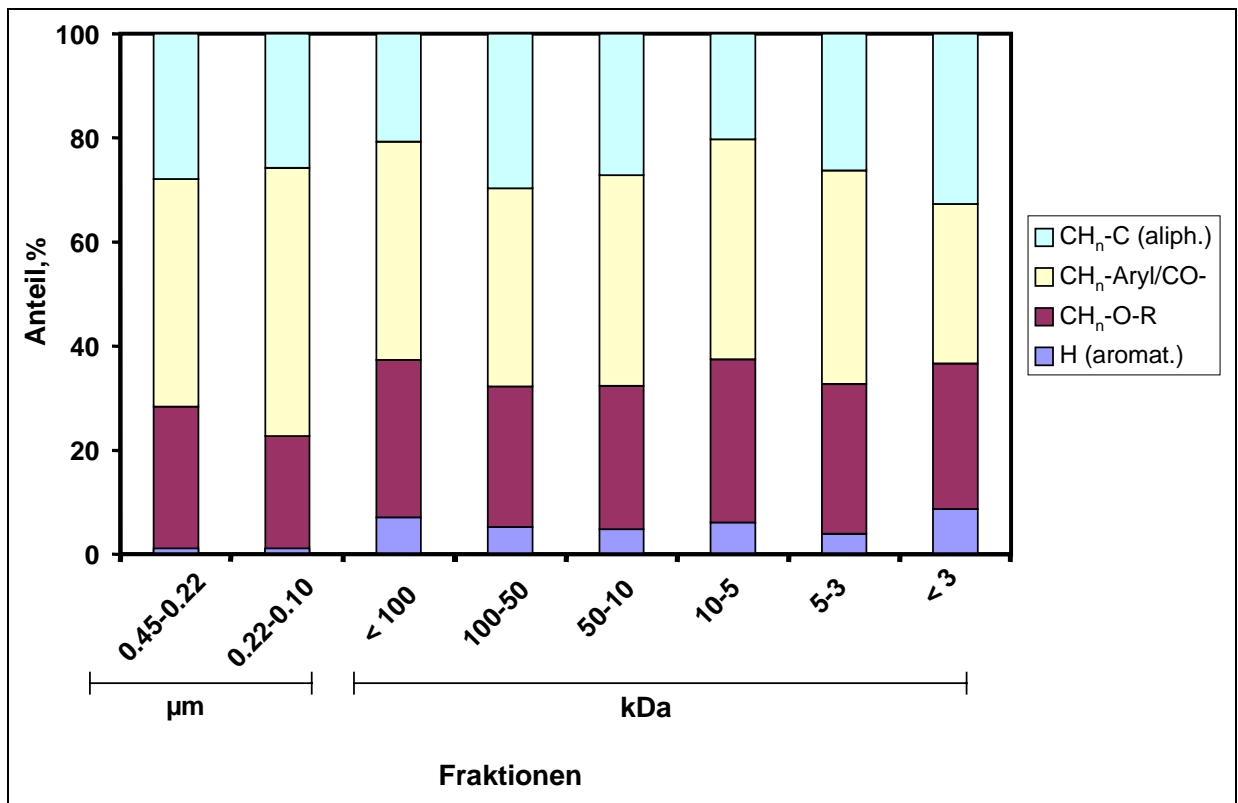


Abb. 20: Signalbereiche in den <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren der (MST-UF) Größenfraktionen von AW3

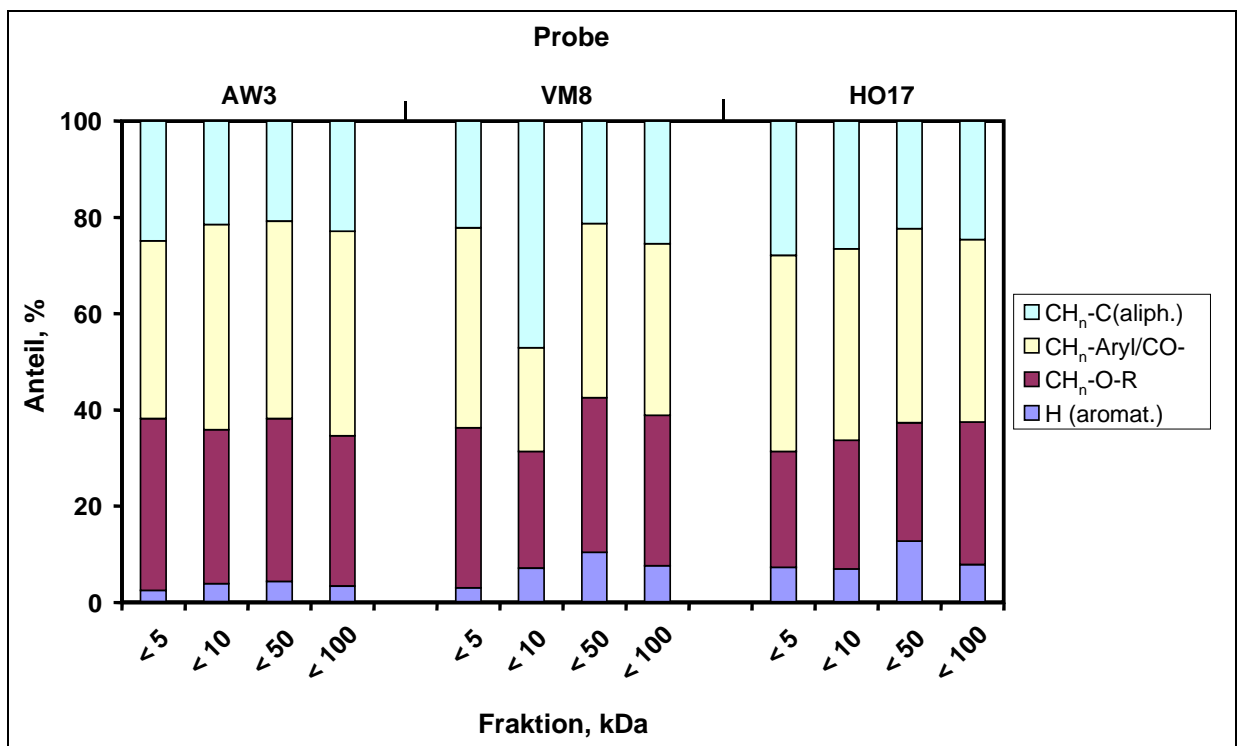


Abb. 21: Signalbereiche in den <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren der P-UF-Größenbereiche von AW3, VM8 und HO17

Der Anteil an aromatischen Protonen ist in allen drei Proben relativ gering, weist jedoch jeweils im Größenbereich von < 50 kDa ein Maximum auf.



#### 4.4.3.3. 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie

Aquatische HS sind, wie bereits in Punkt 3.3. diskutiert, durch eine starke Fluoreszenz gekennzeichnet, die zu ihrer Charakterisierung genutzt werden kann. Insbesondere die 2D-Fluoreszenzspektroskopie ermöglicht die Erfassung charakteristischer Fluorophore in gelösten HS [8]. Je nach Anregungswellenlänge werden dabei unterschiedliche Fluorophore angeregt. Aus diesem Grund wurden die vor Ort gewonnenen Größenfraktionen der beprobten Referenzgewässer im Labor außer durch NMR auch durch Fluoreszenz-Spektroskopie (Spektrometer: Spex Fluoromax, Instruments SA) charakterisiert.

Hierzu wurden die zu untersuchenden Proben mindestens 30 Minuten mit Argon gespült (ca. 10 NL/h) und dann unter thermostatisierten Bedingungen ( $T=23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) gemessen. Die Anregungswellenlängen wurden von 200 bis 600 nm mit 200 Emissionsscans pro 2 nm gefahren. Es wurde ein Emissions-Filter von 310 nm verwendet. Die erhaltenen Emissionswellenlängen wurden zwischen 350 und 700 nm detektiert. Die so erhaltenen Spektren wiesen jeweils zwei Fluoreszenzmaxima mit unterschiedlicher Intensität und Wellenlänge auf. Als typisches Beispiel zeigt Abbildung 22 ein 2D-Fluoreszenz-Spektrum der Referenzwasserprobe VM8, die 24 h nach ihrer Probenahme und nach  $0.45\text{ }\mu\text{m}$ -Vorfiltrierung unter standardisierten Bedingungen gemessen wurde. Dieses Spektrum weist zwei charakteristische Fluorophore mit verschiedenen Intensitäten (counts per second, cps) auf. Unter gleichen Bedingungen wurden die vor Ort gewonnenen Größenbereiche von VM8 mittels 2D-Fluoreszenz vermessen. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind in Tabelle 20 zusammengefasst.

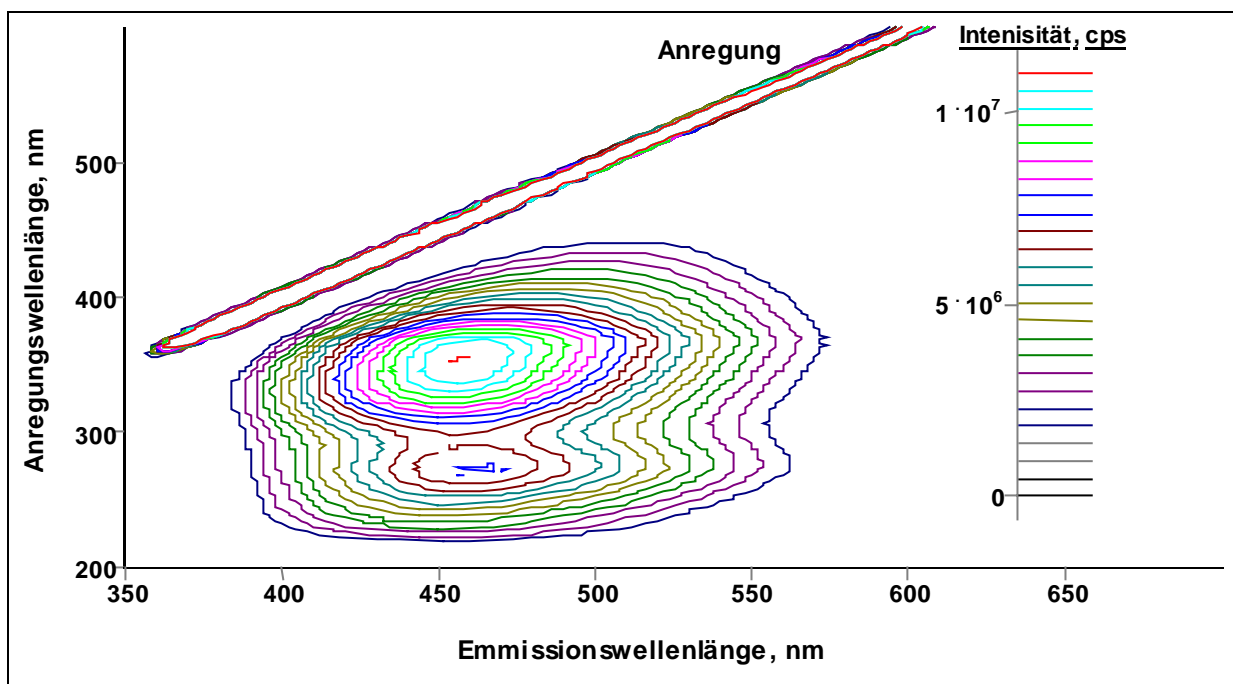


Abb. 22: 2D-Fluoreszenz-Spektrum von VM8 (Probenlagerung ein Tag)

**Tab. 20:** 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie von VM8 und ihren P-UF-Größenbereichen

Größenbereich	Anregungs- wellenlänge, nm	Emmissions- wellenlänge, nm	Intensität, cps	Intensitätsverhältnis
< 5 kDa	328	442	$4.50 \cdot 10^6$	0.77
	236	428	$5.87 \cdot 10^6$	
< 10 kDa	334	454	$12.0 \cdot 10^6$	0.99
	268	460	$12.1 \cdot 10^6$	
< 50 kDa	338	454	$12.1 \cdot 10^6$	1.03
	268	460	$11.8 \cdot 10^6$	
< 100 kDa	340	454	$12.0 \cdot 10^6$	1.15
	269	460	$10.4 \cdot 10^6$	
<b>VM8</b>	<b>354</b>	<b>456</b>	<b><math>11.3 \cdot 10^6</math></b>	<b>1.52</b>
	<b>272</b>	<b>463</b>	<b><math>7.46 \cdot 10^6</math></b>	

Wie ersichtlich, verschieben sich die Emmissionsmaxima der beiden Fluorophore und ihr Intensitätsverhältnis zueinander deutlich in Abhängigkeit vom HS-Molekülgrößenbereich: je größer dieser Bereich ist, desto höher werden die Emmissionswellenlängen. Der kleinste Bereich < 5 kDa weist z.B. zwei Emmissionsmaxima bei 442 und 428 nm mit vergleichsweise geringen Intensitäten auf. Wahrscheinlich sind die für die HS-Fluoreszenz verantwortlichen aromatischen Ringsysteme und konjugierten Doppelbindungen hauptsächlich in den Bereichen mit hochmolekularen Einheiten enthalten, während die kleinste Fraktion von < 3 kDa ( aus MST-UF erhalten) relativ viel Fettsäure enthält, wie das  $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum diesbezüglich bereits aufzeigte.

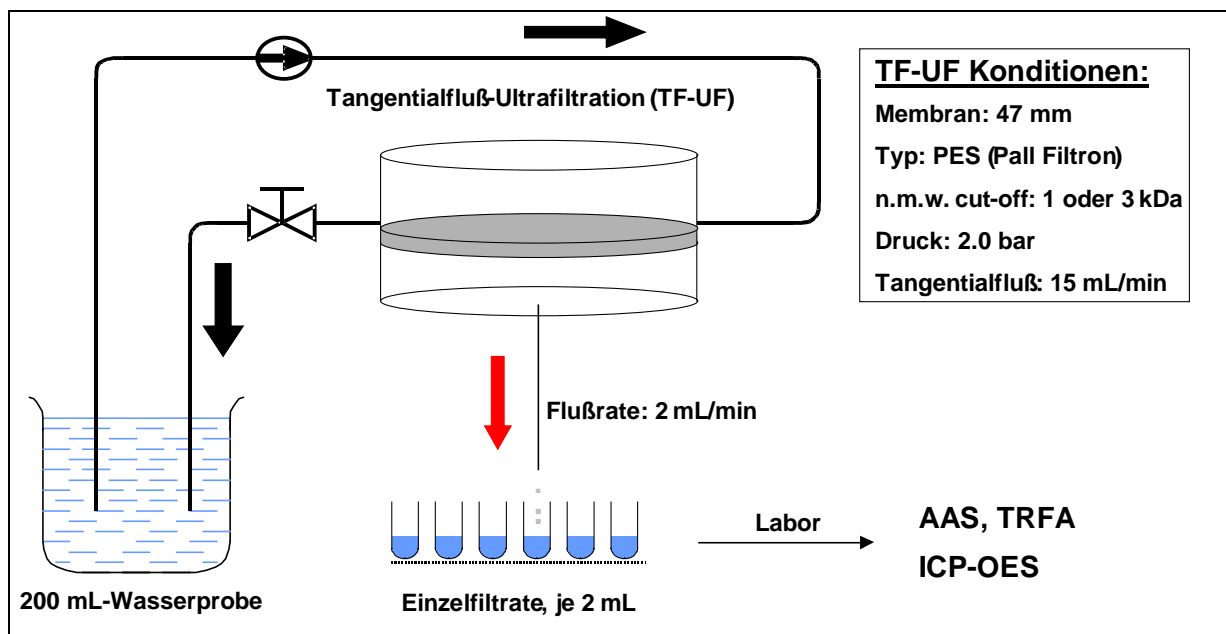
## 4.5. Liganden-Austausch an Huminstoff-Metallspezies

Die Gesamt-Stabilität von HS-Metallspezies setzt sich, wie schon in Punkt 3.6. diskutiert, in verwickelter Weise aus thermodynamischen und kinetischen Faktoren zusammen. Diese Faktoren lassen sich mit Hilfe eines konkurrierenden Ligandenaustauschs ( $L_K$ ) erfassen und somit auch die Gesamt-Stabilität aquatischer HS-Metallspezies. In der vorliegenden Arbeit wurde Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) als starker konkurrierender Ligand, in Anlehnung an eine vorausgehende ROSIG-Arbeit [15], benutzt. Die entstehenden Gleichgewichte der am Austausch beteiligten HS-Metallspezies lassen sich nach Gleichung 32 formulieren.



Mit einem Überschuß an EDTA lassen sich die Gleichgewichte in Gleichung 32 weitgehend nach rechts verschieben.

Die durch Austauschreaktionen entstandenen Spezies (HS und Me-EDTA) lassen sich vor Ort durch eine zeitkontrollierte einstufige Tangentialfluß-Ultrafiltration (TF-UF) in Abhängigkeit von der Reaktionszeit differenzieren, die Metallanalytik folgt später im Labor. In Abbildung 23 wird das analytische Verbundverfahren dargestellt. Das Trennprinzip ist einfach: die in Abhängigkeit von der Zeit gebildeten Me-EDTA-Komplexe werden praktisch quantitativ durch die Membran filtriert, die noch nicht umgesetzten HS-Metallspezies zurückgehalten. Eine zeitkontrollierte Filtration kann durch zeitlich gesteuerten Druckaufbau (max. 2 bar) über ein Ventil gesteuert werden, wobei der Tangentialfluß von ursprünglich 15 mL/min um ungefähr 75 % reduziert wird. Auf diese Weise ist es möglich, innerhalb von zwei Minuten zeitlich definierbare Einzelfiltrate von je 2 mL zu erhalten.



**Abb. 23:** Analytisches Verbundverfahren zur Vor-Ort-Charakterisierung von HS-Metallspezies

Vor den eigentlichen Austauschversuchen wurde die benutzte TF-UF-Einheit auf ihr Sorptionsvermögen gegenüber gelösten HS untersucht. Hierzu diente eine Probe von HO14 bei ihrem natürlichen pH-Wert von 4.0, die nach 19 Stunden durch eine 3 kDa-Membran filtrierte wurde. Die Membran wurde anschließend mit 50 mL 0.1 M NaOH eluiert, um adsorbierte HS in Lösung zu bringen. Dieses „Eluat“ wie auch die Ausgangslösung wurden dann bei 254 nm UV-spektroskopisch miteinander verglichen. Das Verhältnis zeigte einen HS-Verlust von  $2.07 \pm 0.42 \%$  ( $n=3$ ), der durch Sorption auf der Membranoberfläche entsteht, entsprechend einer HS-Beladung von  $9.15 \mu\text{g DOC/cm}^2$ .

Darüber hinaus wurde auch die Penetration „freier“ und mit EDTA komplexierter Metallionen durch die eingesetzte Membran untersucht. Hierzu wurden je 100 mL  $\text{Cu}^{2+}$ - und  $\text{Fe}^{3+}$ -Lösung ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ) bei pH 5 filtrierte und die Metallkonzentrationen im Filtrat und in der Originallösung mittels FAAS bestimmt. In einem weiteren Experiment wurden  $\text{Cu}^{2+}$ -,  $\text{Fe}^{3+}$ - und  $\text{Zn}^{2+}$ -Ionen, je  $40 \mu\text{mol/L}$ , bei pH 5 mit einer equimolaren Menge an EDTA zusammengegeben. Nach der UF wurden auch hier die genannten Metalle in Filtrat und Ausgangslösung mittels FAAS bestimmt. Die Tabelle 21 faßt das Ergebnis dieser Experimente zusammen, dargestellt in % Penetration für die untersuchten Metallionen bzw. EDTA-Komplexe. Diese UF-Experimente wurden jeweils dreimal wiederholt.

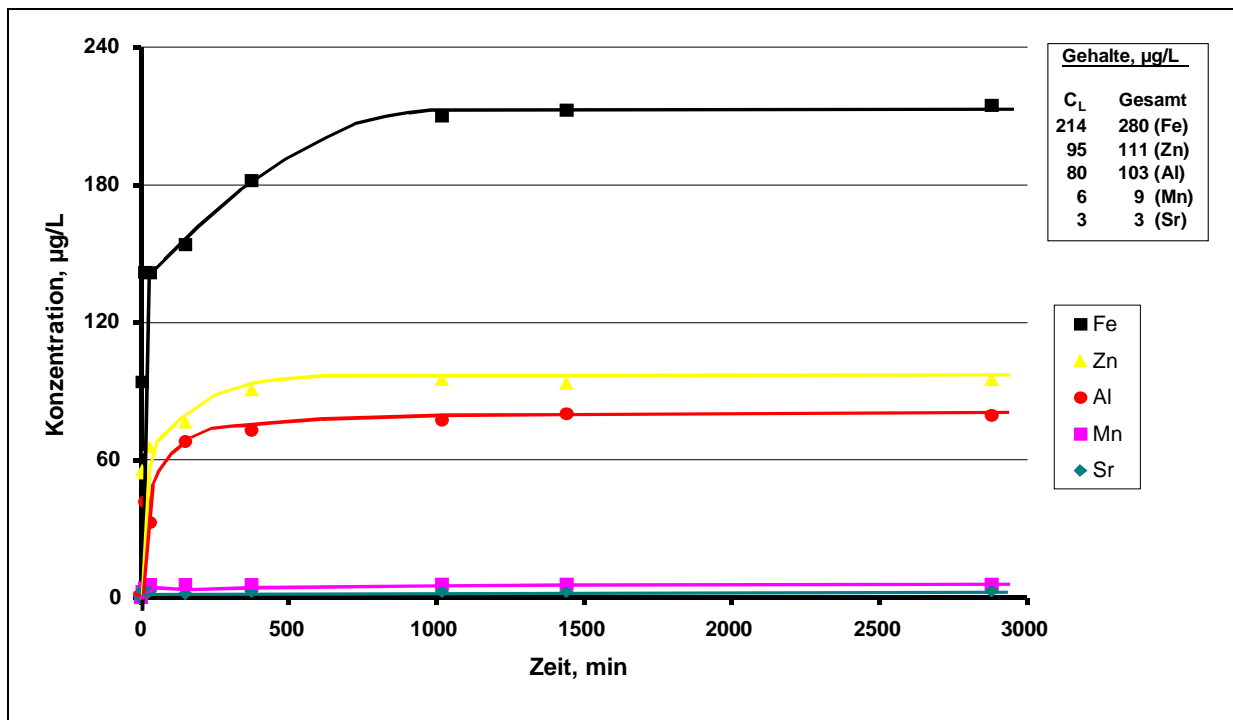
**Tab. 21:** TF-UF-Penetration durch ein 3 kDa-Membran

Spezies	$\text{Cu}^{2+}$	$\text{Fe}^{3+}$	Cu-EDTA	Fe-EDTA	Zn-EDTA
$\Delta, \%$	$96.0 \pm 2.2$	$97.2 \pm 1.4$	$94.8 \pm 3.6$	$95.8 \pm 2.2$	$94.6 \pm 2.0$

Aus diesen Ergebnissen ist abzuleiten, daß die „freien“ wie auch die mit EDTA komplexierten Metalle, wie gewünscht, fast quantitativ durch die 3 kDa-Membran filtriert werden können. Demnach eignet sich die TF-UF-Einheit, ausgerüstet mit einer 3 kDa-Membran, für die geplanten Trennungen von HS-Metallspezies und freien bzw. EDTA-komplexierten Metallionen. Erfahrungsgemäß können die benutzten PES-Membranen (Pall Filtron Omega) für 5 bis 10 Trennversuche eingesetzt werden. Vor ihrer Benutzung wurden sie mit 0.1 M NaOH bzw. mit 0.1 M HCl gereinigt und zum Schluß mit deionisiertem Wasser neutral gespült.

#### **4.5.1. Vor-Ort-Austausch mit EDTA**

Das beschriebene analytische Instrumentarium, bestehend aus einem EDTA-Austausch aquatischer Metallspezies und zeitkontrollierter TF-UF vor Ort mit nachfolgender Quantifizierung im Labor, wurde an verschiedenen Referenzgewässern erprobt. Bei dem eigentlichen Vor-Ort-Austausch mit EDTA wurde zunächst die HS-Konzentration in den 0.45 µm-filtrierten Wasserproben mittels mobilem UV/VIS-Spektrometer bestimmt, um grob deren HS-Komplexierungskapazität KK gegenüber Cu(II) abschätzen zu können (meist etwa 2 µmol/mg DOC). Auf Basis der ermittelten KK wurde abgeschätzt, wieviel µmol EDTA einer 200 mL-Probe zugegeben werden mußte, um ein KK/EDTA-Verhältnis von 1/1 zu erhalten. Vor der EDTA-Zugabe wurde die Probe zunächst ungefähr fünf Minuten tangential über die Membran gepumpt, um diese zu konditionieren. Dann wurde eine erste Probe („Nullprobe“) filtriert, welche die „freien“ und an sehr kleine HS-Moleküle gebundenen Metalle vor dem EDTA-Austausch enthielt. Danach wurde die zuvor ermittelte Menge an EDTA zugegeben und der Probe jeweils nach 5, 15, 30, 60, 150, 240, 480, 1440 und 2880 Minuten ein Teilfiltrat von je 2 mL entnommen, das für die nachfolgende Metallanalytik (AAS, TXRF, ICP-OES) im Labor ausreichend war. Die Abbildung 24 gibt den zeitlichen Verlauf des EDTA-Austausches von HO16 wieder, wobei  $C_L$  die Konzentration der jeweiligen Metallspezies ist, die sich bis zum Erreichen des Austauschgleichgewichtes ( $t \rightarrow \infty$ ) mit EDTA umgesetzt hatte. Zum Vergleich sind die Metall-Gesamtkonzentrationen angegeben.



**Abb. 24:** Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit EDTA  
 (Probe: **HO16**, 0.45 µm-vorfiltriert, pH 3.5, KK/EDTA≈1/1)

Wie ersichtlich, erreicht  $C_L$  von Fe (76 %) erst nach rund 1000 Minuten seinen Gleichgewichtswert und  $C_L$  von Zn (86 %), Al (78 %) und Mn (67 %) schon nach etwa 500 Minuten. Diese Elemente zeigen gegenüber EDTA zwei unterschiedliche Austauschschritte, einen relativ schnellen bis ungefähr 60 Minuten und nachfolgend einen relativ langsamen. Abbildung 25 zeigt einen ähnlichen Verlauf des EDTA-Austausches der Metallspezies in VM8 und Abbildung 26 in AW3. In diesen Wasserproben nimmt der EDTA-Austausch an den natürlichen kolloidalen Metallspezies einen vergleichbaren Verlauf, auch wenn sich die Metallgesamtgehalte teilweise deutlich voneinander unterscheiden.

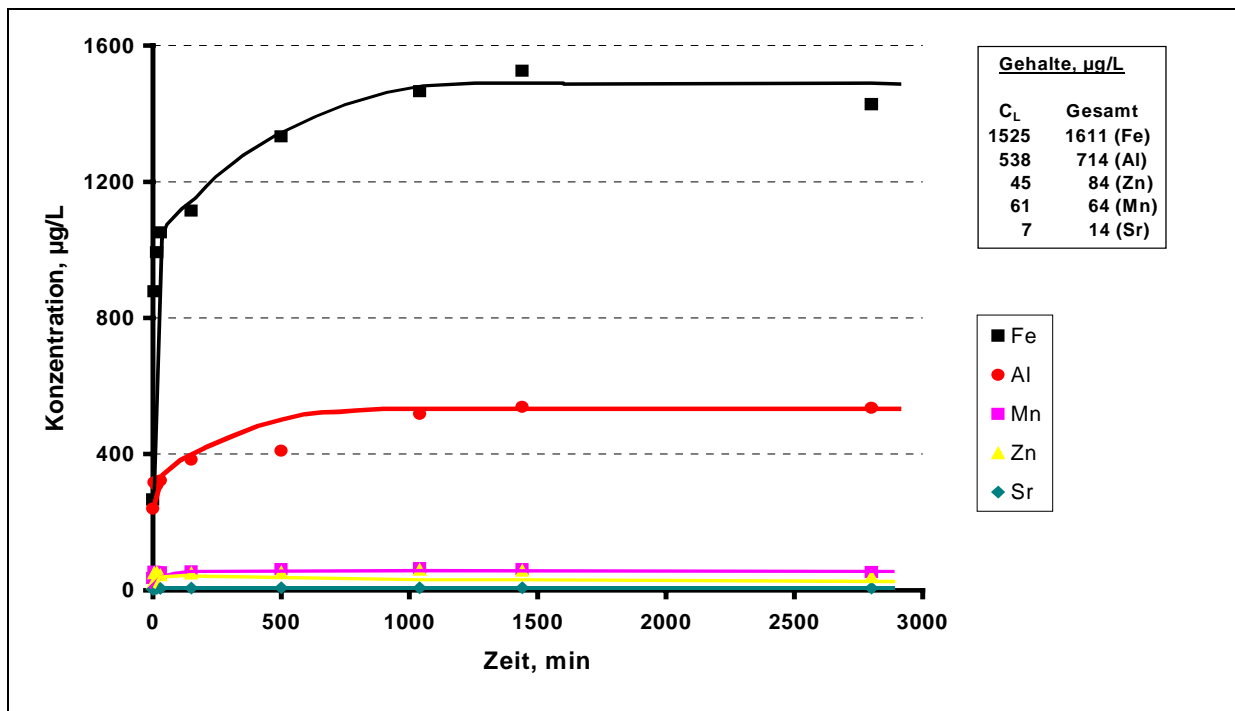


Abb. 25: Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit EDTA  
(Probe: VM8, 0.45 µm-vorfiltriert, pH 4.2, KK/EDTA≈1/1)

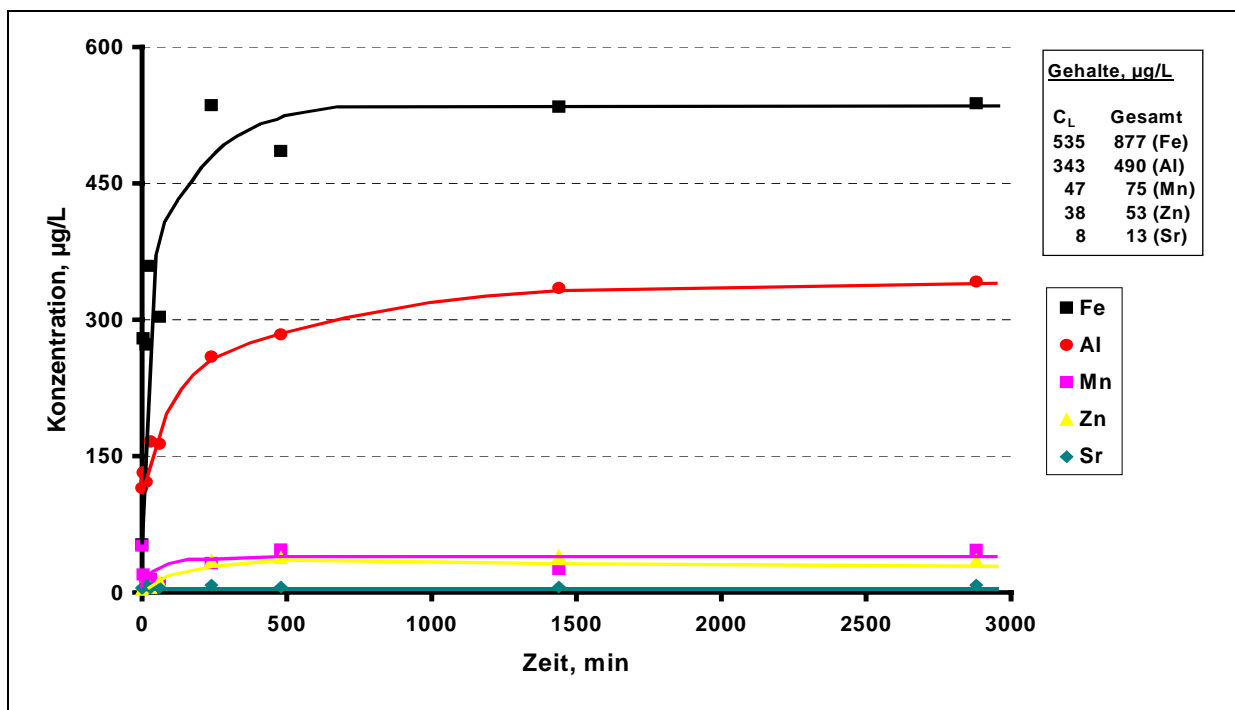


Abb. 26: Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit EDTA  
(Probe: AW3, 0.45 µm-vorfiltriert, pH 3.9, KK/EDTA≈1/1)

In Tabelle 22 wird eine Übersicht gegeben über die untersuchten Referenzgewässer und die Verfügbarkeit ihrer Al-, Fe-, Mn-, Zn-, Mg-, Sr-, und Ca-Ionen gegenüber EDTA, die in der beschriebenen Weise vor Ort ermittelt wurde. Wenn man z.B. die EDTA-Verfügbarkeit von Al in den verschiedenen Wasserproben vergleicht, ergibt sich ein Mittelwert von etwa 75 %, VM9 ausgenommen. Für Fe findet man eine mittlere EDTA-Verfügbarkeit von etwa 85 % und

für Mn eine solche von etwa 73 %. Bei den Erdalkalitionen Mg, Ca und Sr kann man nicht von einer Gleichverteilung ausgehen. Diese Ionen sind allerdings aufgrund ihrer relativ schwachen EDTA-Komplexe mit Bruttostabilitätskonstanten  $K$  im Bereich von  $10^4$  bis  $10^6$  als Sonderfall zu betrachten [119]. Aus den gemessenen Gleichgewichtspunkten (horizontaler Abschnitt der in Abb. 24-26 gezeigten Kurven), meistens drei, je nach Element, läßt sich ein mittlerer Fehler von 1 bis 6 % für die in Tabelle 22 angegebene EDTA-Verfügbarkeit abschätzen. Vermutlich war die vorgegebene EDTA-Konzentration nicht ausreichend, um die Erdalkali-Spezies weitgehend aus ihren HS-Bindungen zu verdrängen. Die VM9-Probe wurde unter extremen Randbedingungen genommen, da das Venner Moor zum Zeitpunkt der Beprobung (21.07.1999) zu einem großen Teil eingetrocknet war. Dies erklärt die starken Abweichungen von den anderen Proben. Man kann weiterhin sehen, daß innerhalb der Proben aus einem Gewässer (VM, HO, AW) der EDTA-Austausch unterschiedlich verläuft, z.B. ist bei VM8  $C_L$  der verschiedenen Metalle größer als bei VM7. Das Gleiche findet man auch bei den HO- und AW-Serien. Möglicherweise spielen hier die verschiedenen Jahreszeiten (s. Tab. 8-10), in denen die Beprobungen stattfanden, eine Rolle.

**Tab. 22:** Labilität von natürlichen HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit EDTA

Element	VM7	VM8	VM9	HO16	HO17	AW3	AW4
<b>Al</b> -Gesamt, µg/L	650	714	732	103	80	490	550
EDTA-verfügbar, %	70 ± 3	75 ± 2	9 ± 1	78 ± 2	65 ± 1	70 ± 3	91 ± 1
<b>Fe</b> -Gesamt, µg/L	1657	1611	2250	280	217	877	819
EDTA-verfügbar, %	89 ± 2	95 ± 4	11 ± 2	76 ± 1	94 ± 1	61 ± 4	99 ± 1
<b>Mn</b> -Gesamt, µg/L	72	64	80	9	6	75	115
EDTA-verfügbar, %	65 ± 2	95 ± 1	9 ± 2	67 ± 1	61 ± 2	62 ± 4	86 ± 4
<b>Zn</b> -Gesamt, µg/L	108	84	85	111	81	53	96
EDTA-verfügbar, %	56 ± 2	54 ± 1	6 ± 2	86 ± 2	37 ± 2	72 ± 1	*
<b>Mg</b> -Gesamt, µg/L	912	820	1162	166	99	929	1625
EDTA-verfügbar, %	42 ± 2	61 ± 2	7 ± 1	49 ± 2	10 ± 1	51 ± 2	86 ± 6
<b>Sr</b> -Gesamt, µg/L	16	14	17	3	2	13	29
EDTA-verfügbar, %	44 ± 1	50 ± 1	7 ± 1	67 ± 1	50**	62 ± 1	80 ± 2
<b>Ca</b> -Gesamt, µg/L	3093	3150	3054	479	248	2582	3393
EDTA-verfügbar, %	44 ± 2	54 ± 4	8 ± 1	36 ± 4	26 ± 2	59 ± 3	88 ± 6

KK/EDTA $\approx$ 1/1, \*nicht auswertbar, \*\*abgeschätzter Wert

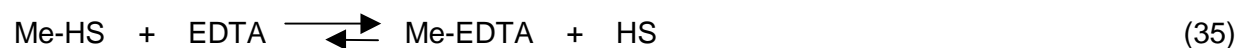


Neben den beschriebenen Gleichgewichten des EDTA-Austausches läßt sich auch dessen Kinetik zur Charakterisierung der untersuchten hydrokolloidalen Metallspezies heranziehen. Allgemein geht man von der Existenz von 1:1-Komplexen zwischen einem Metallion Me und einem HS-gebundenen Liganden aus, die im Gleichgewicht mit ihren Dissoziationsprodukten stehen. Nach diesem kinetischen Modell [120] sollte jeder Me-HS-Komplex in einfacher Weise nach einer Reaktion erster Ordnung dissoziieren, wie in Reaktionsgleichung 33 dargestellt ist, wobei  $k_i$  die Geschwindigkeitskonstante dieser Dissoziation ist. Das dissoziierte Metall setzt sich dann mit dem konkurrierenden EDTA zum EDTA-Komplex um (Gl. 33).

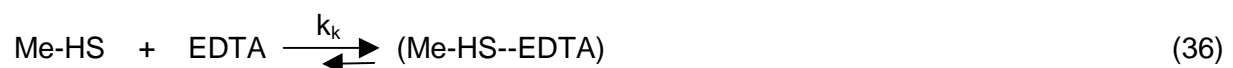
Die Komplexierung von Metallionen durch EDTA verläuft allgemein viel schneller als die Dissoziation von HS-Metallkomplexen, sodaß die Dissoziation nach Gleichung 34 als geschwindigkeitsbestimmender Schritt betrachtet werden kann ( $k_j \gg k_i$ ).



Die Reaktionsgleichungen 33 und 34 führen schließlich zum Gleichgewicht (Gl. 35):



Ein anderer denkbarer Reaktionsmechanismus wäre eine vorausgehende Verbrückung negativ geladener EDTA-Liganden mit positiv geladenen HS-Metallspezies. Dann wäre der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des EDTA-Austausches das Lösen der Verbrückung unter Bildung des neuen EDTA-Komplexes. Wie in den Gleichungen 36 und 37 dargestellt. Hierbei wird vorausgesetzt, daß  $k_k \gg k_i$ .



Auch die Reaktionsgleichungen 36 und 37 führen zu einem Gleichgewicht, wie in Gleichung 35 beschrieben.

Werden die betrachteten HS-Metallspezies durch EDTA in dieser Weise nach einer Kinetik erster Ordnung ausgetauscht, läßt sich in beiden Fällen die allgemeine Geschwindigkeitsgleichung (38) zur Charakterisierung nutzen.

$$c = c_0 \cdot e^{-k_i \cdot t} \quad (38)$$

Hierbei ist  $c_0$  die Konzentration des jeweiligen HS-Metallkomplexes zum Zeitpunkt  $t=0$ . Da nicht die gesamten Metallkomplexe mit EDTA reagieren sondern nur ihr verfügbarer EDTA-Anteil  $C_L$ , läßt sich der Umsatz  $x$  wie in Gleichung 39 definieren:

$$x = \frac{c_{Me}}{c_L} \quad (39)$$

Hierbei ist  $c_{Me}$  die Konzentration des aus HS freigesetzten Metalls zum Zeitpunkt  $t$  und  $c_L$  die Konzentration der labilen Metallspezies. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß bereits vor dem EDTA-Austausch geringe Gehalte an freien Metallionen vorliegen. Diese sind formal  $C_L$ . Beim Erreichen des Austauschgleichgewichtes gilt:

$$\lim_{t \rightarrow +\infty} x = 1 \quad (40)$$

Bei  $t=0$  gilt:

$$\lim_{t \rightarrow 0} x = 0 \quad (41)$$

So ergibt sich folgende kinetische Beziehung (42):

$$x = \frac{c_{Me}}{c_L} = 1 - e^{-k_i \cdot t} \quad (42)$$

Durch Umformung erhält man (43):

$$\ln \left( \frac{c_L - c_{Me}}{c_L} \right) = -k_i \cdot t \quad (43)$$

Trägt man die Konzentrationsabnahme  $(c_L - c_{Me})/c_L$  logarithmisch als Funktion der Zeit  $t$  auf, erhält man Geraden mit der Steigung  $-k_i$ . Die Halbwertszeit  $t_{1/2}$  der nach erster Ordnung austauschenden Metallspezies kann man wie folgt berechnen:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_i} \quad (44)$$

Auf Basis von Gleichung 43 ist in Abbildung 27 der EDTA-Austausch natürlicher Metallspezies in der Referenzprobe kinetisch dargestellt. Wie ersichtlich, verläuft die EDTA-Austauschkinetik in zwei recht unterschiedlichen Schritten weitgehend nach erster Ordnung. Nach einer Stunde haben etwa 80 % der verfügbaren Al-, Fe-, Sr- und Zn-Spezies und 94 % des Ca mit EDTA ausgetauscht. Ihre weitere Konzentrationsabnahme erfolgt wesentlich langsamer mit formalen Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  zwischen 200 und 800 Minuten, je nach Element. Nach 1000 Minuten liegt der Umsatz des EDTA-labilen Al und Fe bei 97 %, für Ca bei 98 % und für Sr und Zn bei nahezu 100 %. In gleicher Weise ist in Abbildung 28 der Vor-Ort-Austausch natürlicher Metallspezies mit EDTA in der Referenzprobe VM8 dargestellt. Wie ersichtlich, verläuft der EDTA-Austausch auch in diesem stark HS-haltigen Wasser

(83.3 mg/L DOC) in zwei unterschiedlich schnellen Schritten nach erster Ordnung, abgesehen von ihrem Übergangsbereich. Etwa 60 bis 80 % des Umsatzes entfallen auf vergleichsweise schnell reagierende Metallspezies, z.B. Al, Fe, Mn und Zn. Die restlichen Spezies reagieren nur sehr langsam mit dem angebotenen EDTA, mit Halbwertszeiten von rund 400 Minuten. Einen ähnlichen Verlauf nimmt der EDTA-Austausch auch in der Wasserprobe AW3 (Abb. 29). Eine Übersicht über die Kinetik des EDTA-Austausches natürlicher Fe-Spezies aus verschiedenen Gewässern bzw. Probenahmen vermittelt die Abbildung 30. Demnach lassen sich die Fe-Spezies in den untersuchten Wasserproben kinetisch in zwei Fraktionen unterteilen. Beide Fraktionen reagieren mit EDTA überwiegend nach erster Ordnung. Die Fraktion der schnell reagierenden Fe-Spezies umfaßt rund 70 bis 90 % des EDTA-labilen Fe, die relativ langsam reagierende Fe-Fraktion etwa 10 bis 30 %. Die letztere zeigt zudem eine sehr unterschiedliche Austauschgeschwindigkeit in den einzelnen Proben.

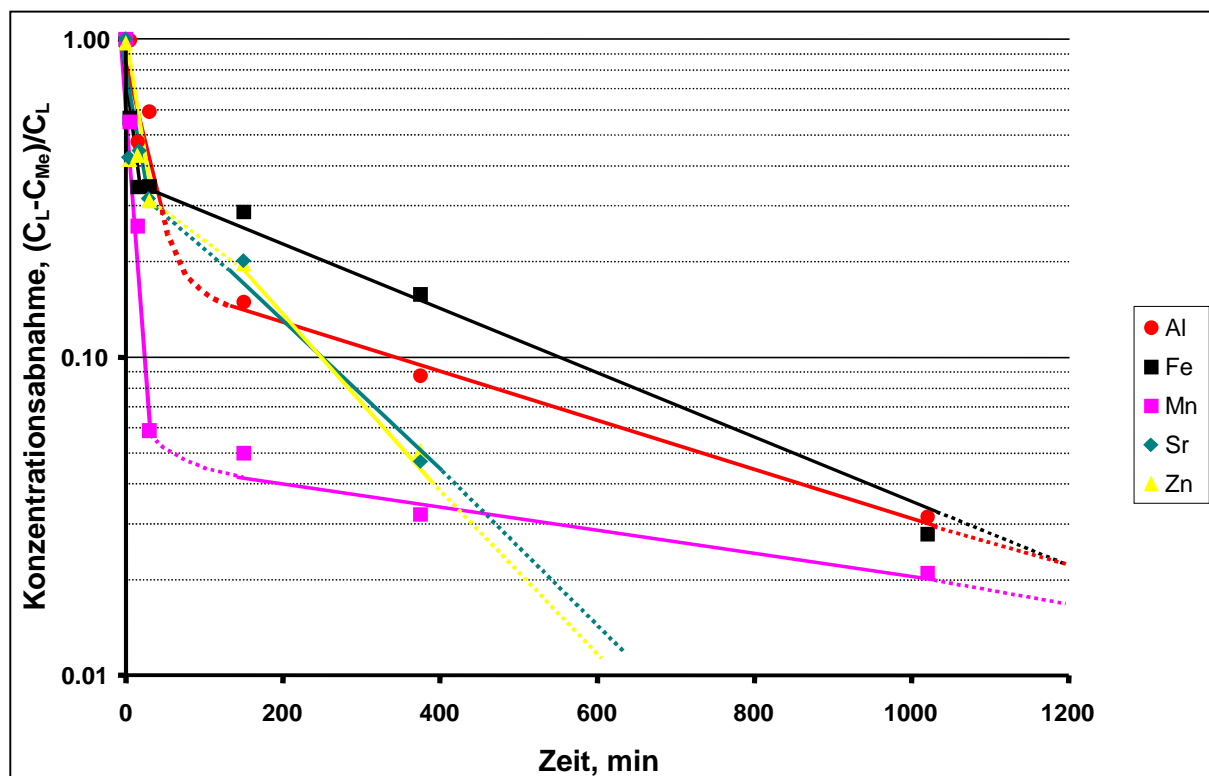


Abb. 27: Vor-Ort-Austausch mit EDTA; Probe: HO16, 0.45 µm-vorfiltriert, KK/EDTA $\approx$ 1/1

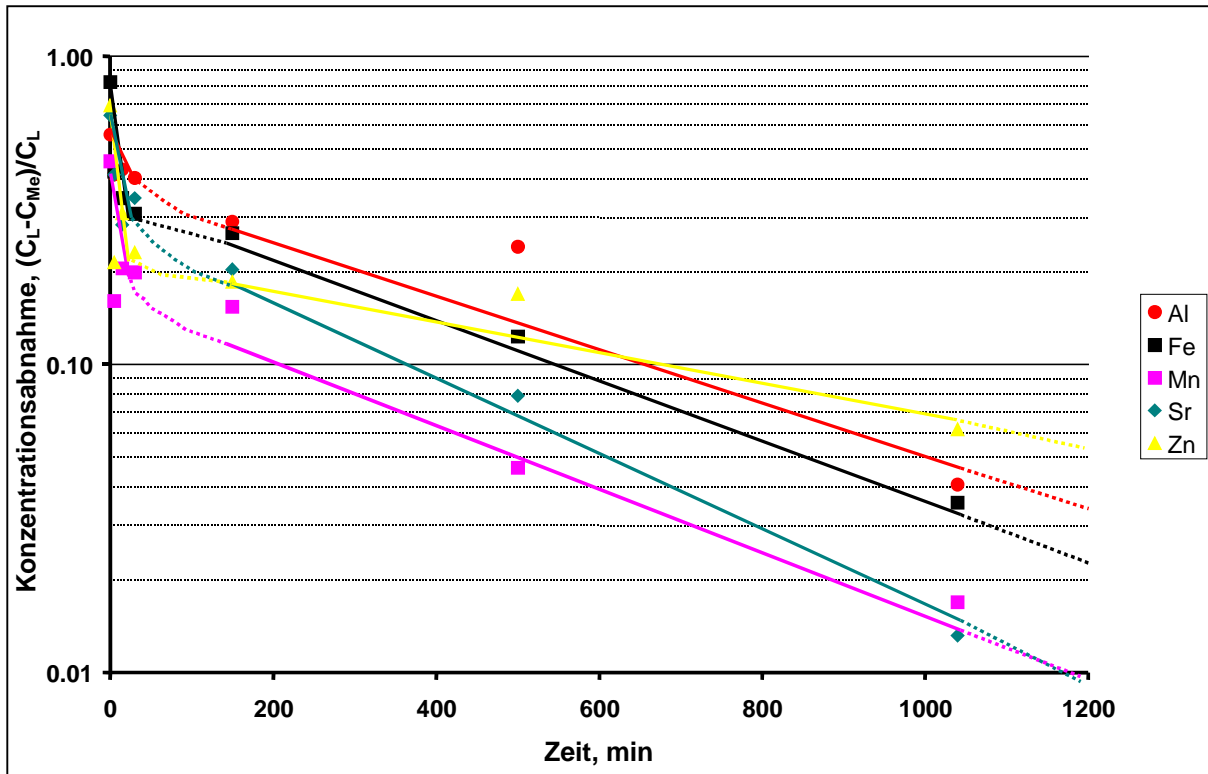


Abb. 28: Vor-Ort-Austausch mit EDTA; Probe: **VM8**, 0.45 µm-vorfiltriert, KK/EDTA $\approx$ 1/1

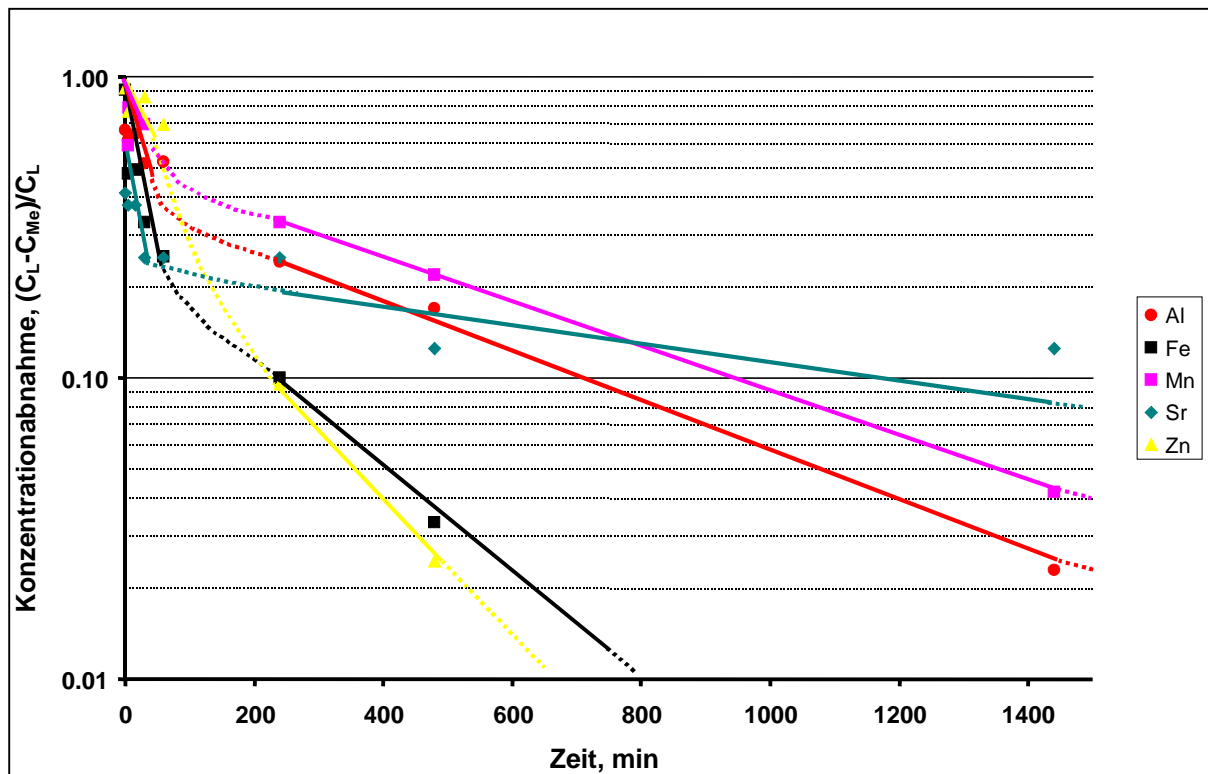


Abb. 29: Vor-Ort-Austausch mit EDTA; Probe: **AW3**, 0.45 µm-vorfiltriert, KK/EDTA $\approx$ 1/1

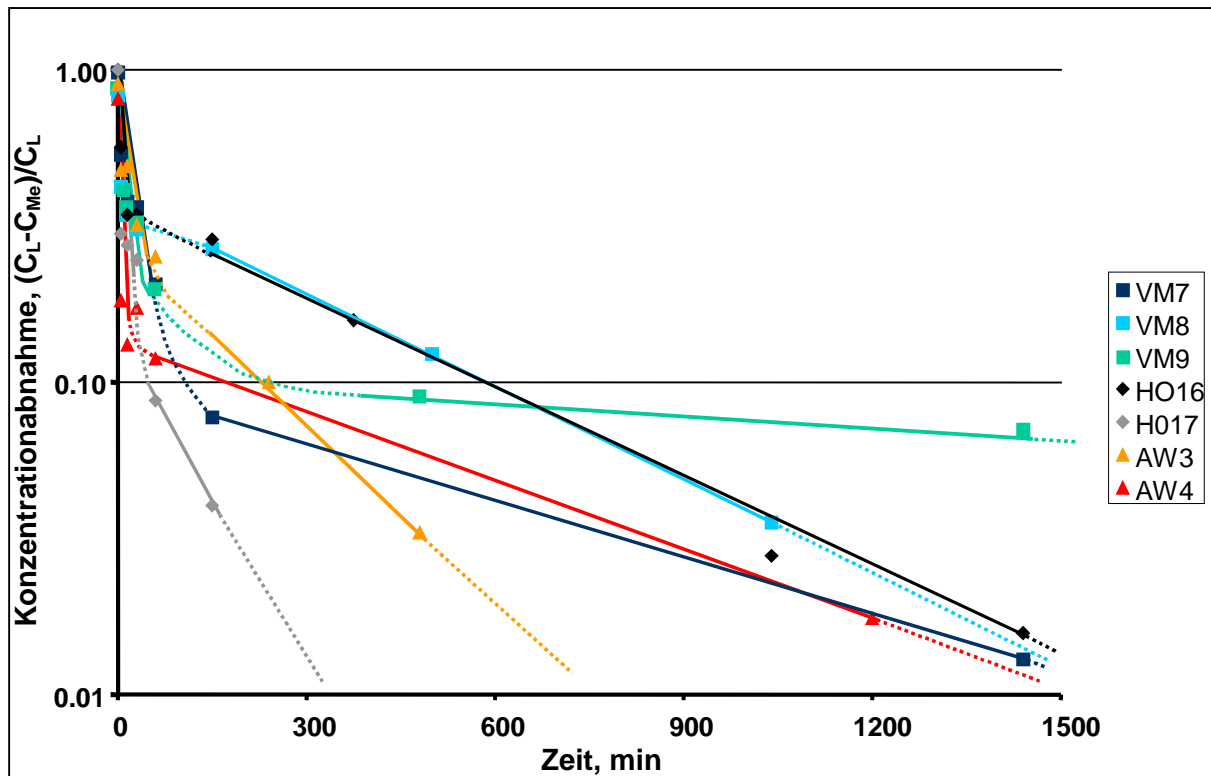


Abb. 30: Vor-Ort-Austausch mit EDTA: Fe, 0.45 µm-vorfiltriert, KK/EDTA≈1/1

Die formalen Geschwindigkeitskonstanten  $k$  und Halbwertszeiten  $t_{1/2}$ , die sich für den EDTA-Austausch der untersuchten Fe-Spezies nach erster Ordnung ergaben, sind in Tabelle 23 zusammengefaßt.

Tab. 23: EDTA-Austausch an aquatischen Fe-Spezies: Geschwindigkeitskonstanten  $k$  und Halbwertszeiten  $t_{1/2}$

Wasserprobe	VM7	VM8	VM9	HO16	HO17	AW3	AW4
$k_1, h^{-1}$	1.79	3.09	2.65	4.01	5.17	2.02	5.43
$t_{1(1/2)}, h$	0.39	0.22	0.26	0.17	0.13	0.34	0.13
$k_2, h^{-1}$	0.08	0.14	0.02	0.13	0.52	0.25	0.10
$t_{2(1/2)}, h$	8.35	5.02	46.2	5.33	1.35	2.76	6.86

Wie ersichtlich ist, schwankt die Geschwindigkeitskonstante  $k_1$  der austauschschnelleren Fe-Fraktion in den untersuchten Wasserproben zwischen 1.78 und 5.43  $h^{-1}$ . Gemäß ihrer  $k_2$ -Werte ist die „langsamere“ Fe-Fraktion etwa um den Faktor 10 bis 50 reaktionsträger gegenüber EDTA. Es ist denkbar, daß die erst genannte Fe-Fraktion aus HS-Fe-Komplexen besteht, die dissoziationsfähig und damit für das EDTA verfügbar sind. Möglicherweise ist die zweite Fe-Fraktion wesentlich schwerer „zugänglich“, z.B. in inneren Bereichen von Hydrokolloiden oder auch gebunden in mineralischen Teilchen, die natürlicher Bestandteil aquatischer HS sein können [16]. Daneben ist zu berücksichtigen, daß an HS gebundenes Fe häufig ein Gemisch von Fe(II) und Fe(III) darstellt [121,122].

#### **4.5.2. EDTA-Austausch an natürlichen, vorangereicherten und artifiziellen HS-Metallspezies**

Eine vorausgehende Untersuchung hat bereits belegt, daß natürliche, mittels UF vorangereicherte HS-Metallspezies eine ganz andere EDTA-Verfügbarkeit aufwiesen als artifizielle, die durch Beladung isolierter HS erzeugt wurden [15]. Deshalb wurden im Rahmen dieser Arbeit die vor Ort mittels EDTA-Austausch charakterisierten, natürlichen HS-Metallspezies, z.B. in der Referenzprobe HO17, einem analogen Vergleich unterzogen. Hierzu dienten zum einen mittels UF vorangereicherte HS-Metallspezies aus derselben Wasserprobe (HO17-UF) und zum anderen artifizielle HS-Metallspezies desselben HS (HO17-XAD 8), die nach seiner Isolierung durch Metallbeladung erzeugt worden waren.

Im Fall von HO17-UF wurde das vorliegende UF-Konzentrat auf seine natürliche Konzentration zurückverdünnt, im Fall von HO17-XAD 8 mit den Metallionen Al(III), Ca(II), Cu(II), Fe(III), Mg(II), Mn(II), Pb(II), Sr(II) und Zn(II) so beladen, daß die zugegebene Metallkonzentration pro DOC-Einheit die gleiche war wie bei HO17 und HO17-UF. Nach 24 stündiger Komplexierung wurde der EDTA-Austausch vorgenommen. Beide Proben wurden auf pH 4.2 eingestellt, damit sie untereinander und mit dem Referenzgewässer HO17 vergleichbar waren.

Der EDTA-Austausch in diesen drei Proben ist in den Abbildungen 31 bis 33 als Funktion der Zeit dargestellt. In Tabelle 24 sind die EDTA-Verfügbarkeiten der Metalle in den besagten Proben einander gegenübergestellt. Wie aus den Abbildungen 31 bis 33 ersichtlich, stellen sich die Austauschgleichgewichte in allen drei Proben innerhalb von 400 bis 500 Minuten ein, ausgenommen Sr in HO17. Besonders schnell verläuft der EDTA-Austausch in der Probe mit den artifiziellen Metallspezies von HO17-XAD 8. Dabei erweisen sich Al, Fe und Zn als weitgehend EDTA-verfügbar (s. Tab. 24), ähnlich wie Al und Fe in der natürlichen Probe HO17. Die vorangereicherten Metallspezies in HO17-UF verlieren offensichtlich einen großen Teil ihrer EDTA-Verfügbarkeit, vermutlich aufgrund von Transformationsprozessen während der Lagerung. Ähnlich wie [15] belegt also auch diese Untersuchung, daß sich artifizielle und natürliche HS-Metallspezies signifikant in ihrer EDTA-Verfügbarkeit unterscheiden. Natürliche HS-Metallspezies, die nach ihrer Voranreicherung mittels UF für längere Zeit gelagert werden, verlieren stark an Metall-Verfügbarkeit.

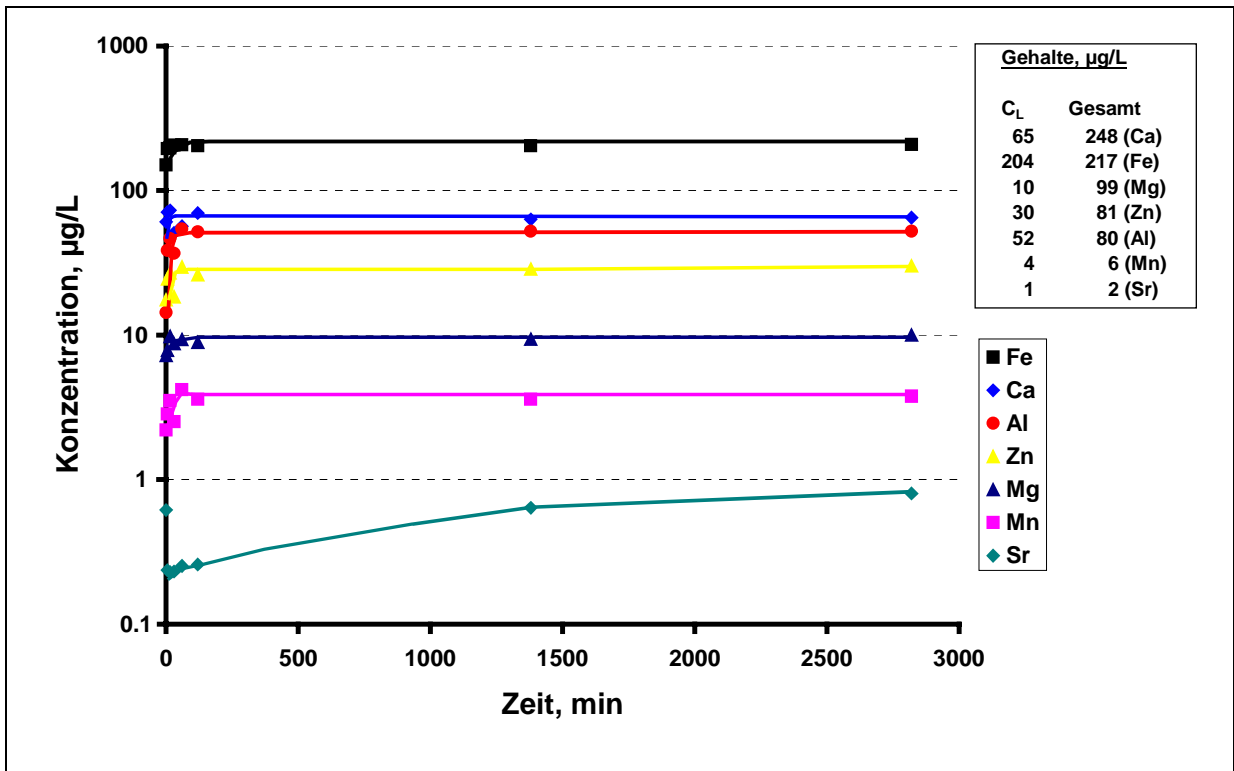


Abb. 31: Natürliche HS-Metallspezies: Austausch mit EDTA  
(Probe: HO17, pH 4.2, KK/EDTA=1/1)

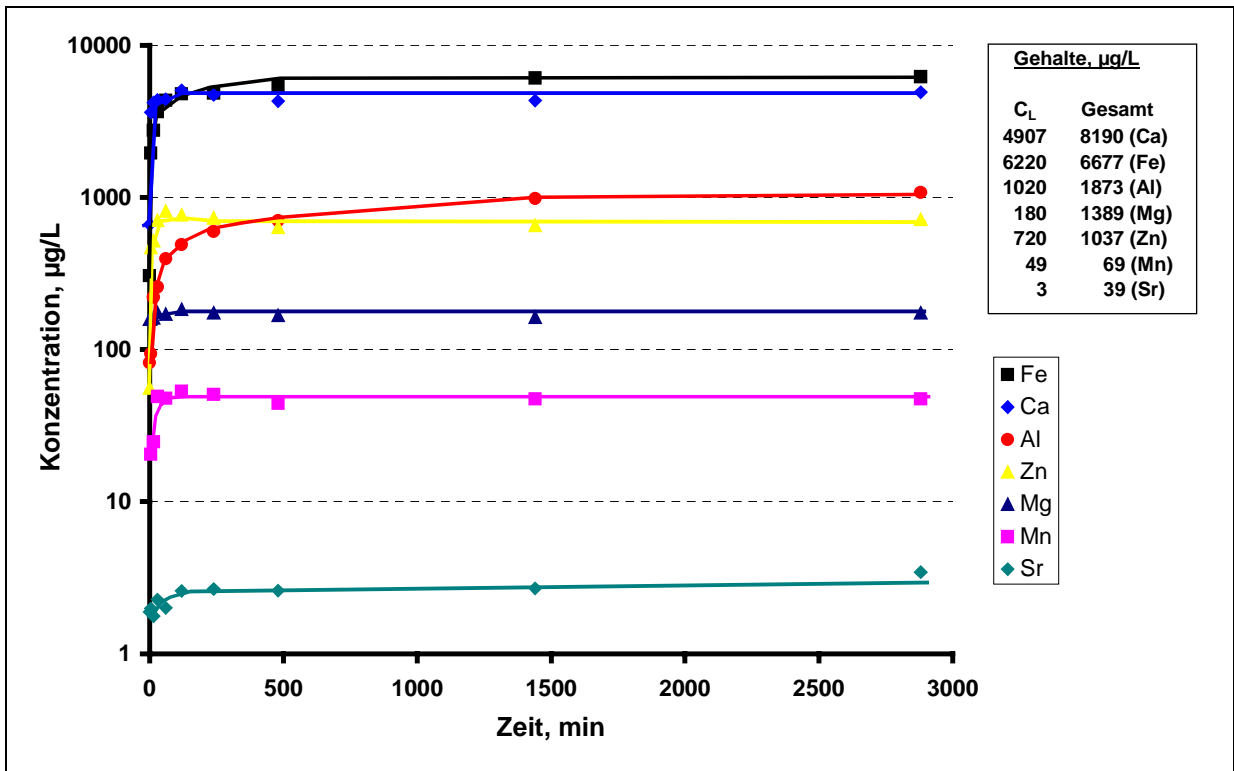
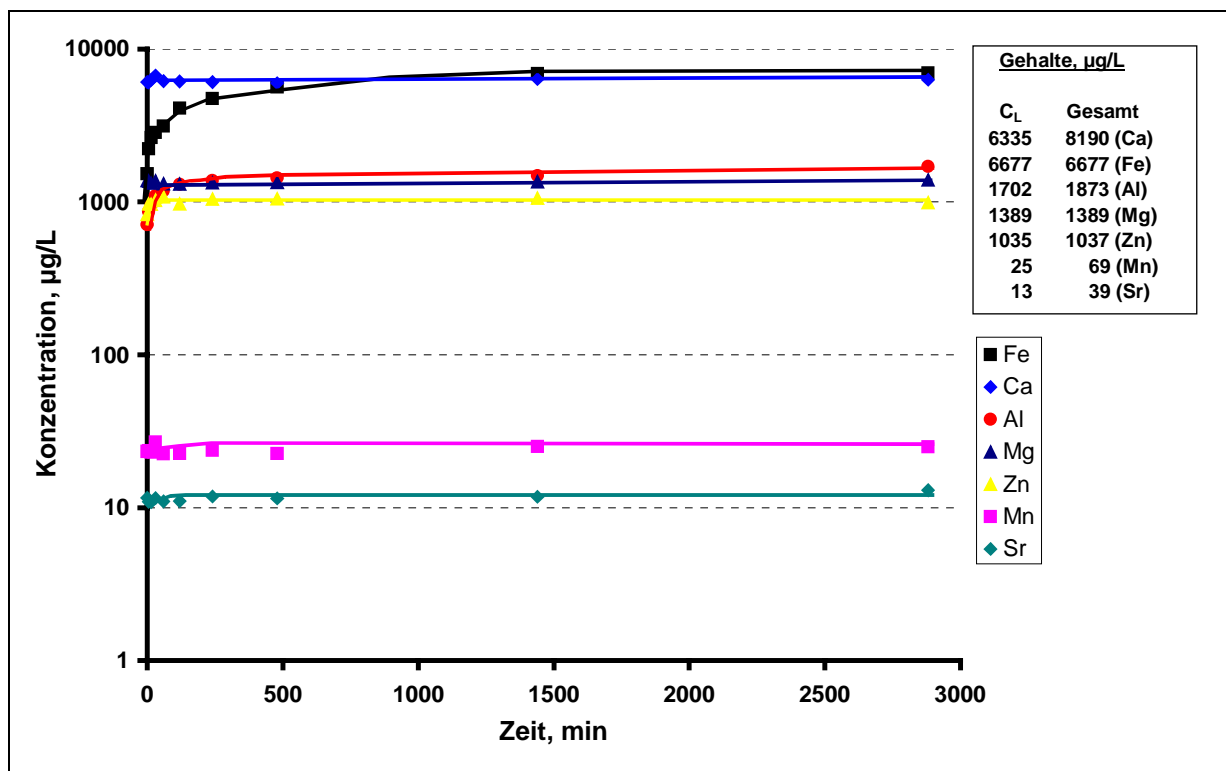


Abb. 32: Vorangereicherte HS-Metallspezies: Austausch mit EDTA  
(Probe: HO17-UF, pH 4.2, KK/EDTA=1/1)



**Abb. 33:** Artificielle HS-Metallspezies: Austausch mit EDTA  
(Probe: **HO17-XAD 8**, pH 4.2, KK/EDTA=1/1)

**Tab. 24:** EDTA-Verfügbarkeit von Metallen in natürlichen, vorangereicherten und artifizierten HS-Metallspezies [%]

Element	HO17*	HO17-UF	HO17-XAD 8
Al	65 ± 1	54 ± 2	91 ± 2
Fe	94 ± 1	93 ± 2	100 ± 2
Mn	61 ± 2	71 ± 1	36 ± 2
Zn	37 ± 2	69 ± 3	99 ± 1
Mg	10 ± 1	13 ± 1	100 ± 1
Sr	50**	8 ± 9	33 ± 3
Ca	26 ± 2	60 ± 4	77 ± 2

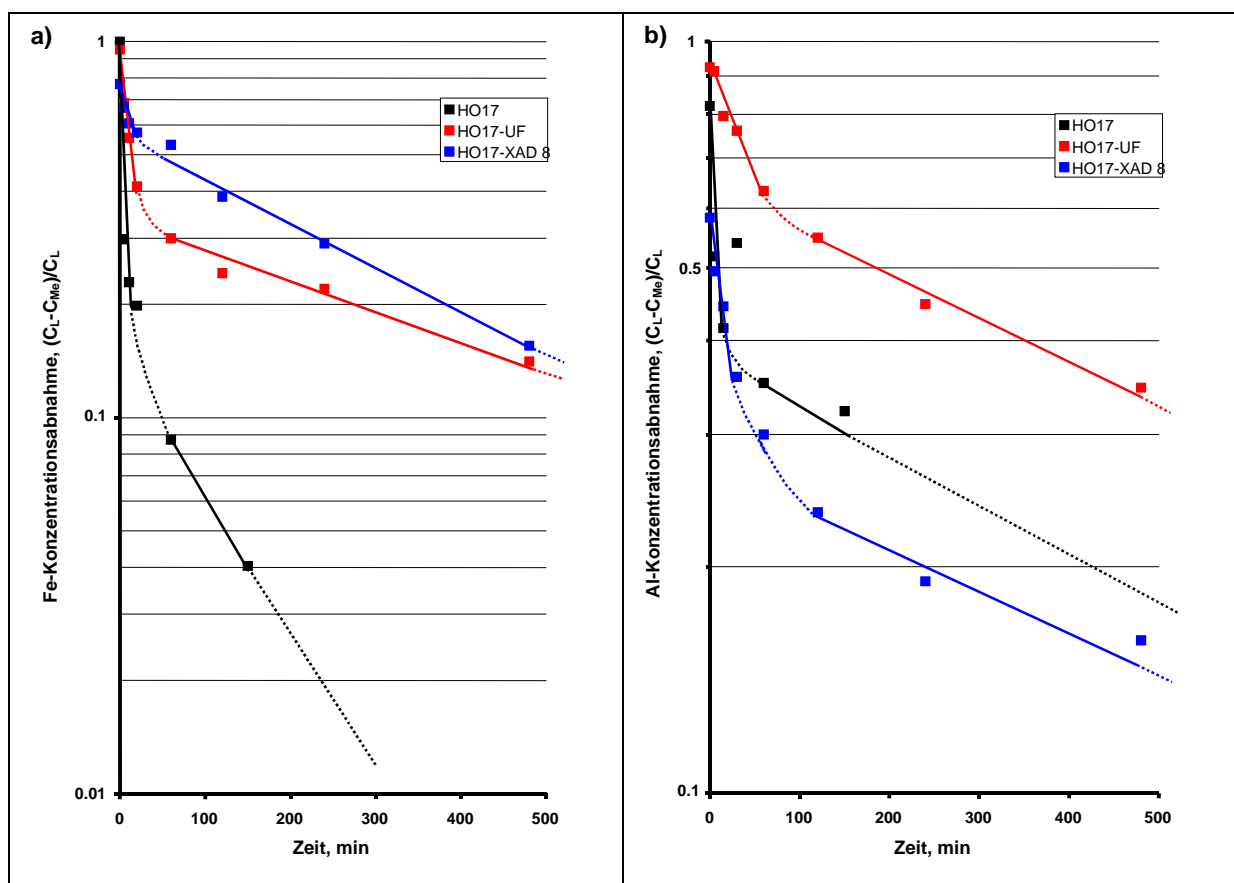
\*Vor-Ort-Austausch, \*\*abgeschätzter Wert

In den Abbildungen 34 a und b ist die Kinetik des EDTA-Austausches von Fe und Al auf Basis von Gleichung 43 dargestellt. Auch hier kann man zwei unterschiedlich schnelle Austauschschritte nach erster Ordnung sowie einen Übergangsbereich feststellen. Der EDTA-Austausch in der vorangereicherten Probe HO17-UF ist für Fe bzw. Al langsamer als in der natürlichen Probe HO17. In der artifizierten Probe HO17-XAD 8 werden die Fe-Spezies



schneller und die Al-Spezies langsamer ausgetauscht als in HO17. Auffallend ist der zeitliche Nullpunkt in den Abbildungen 34 a und b für HO17-XAD 8. Aufgrund erheblicher Gehalte an "freien" Metallionen bereits vor dem EDTA-Austausch beginnt der Austauschumsatz formal bei Werten kleiner eins. Der AI-Wert von 0.58 bedeutet z.B., daß das vorliegende Al nur zu 58 % gebunden ist; für Fe liegt der Wert bei 78 %. Verglichen mit der Originalprobe HO17 liegen diese Werte wesentlich niedriger. Demnach sind die artifiziiellen Spezies auch nach 24 h Komplezierungszeit noch nicht vergleichbar mit den natürlichen.

Wie in Tabelle 25 ersichtlich, sind die formalen Geschwindigkeitskonstanten  $k_1$  und  $k_2$  für Fe und  $k_1$  für Al am größten in HO17, während  $k_2$  für Al praktisch für alle Proben gleich ist. Die verschiedenen Geschwindigkeitskonstanten sind aus den Abbildungen 34 a und b berechnet worden.



**Abb. 34:** EDTA-Austausch natürlicher, vorangereicherter und artifiziieller HS-Metallspezies: Kinetik (a: Fe, b: Al)

**Tab. 25:** EDTA-Austausch an HS-Metallspezies: Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$ 

Probe	HO17*	HO17-UF	HO17-XAD 8
$k_{1(\text{Fe})}$ , $\text{h}^{-1}$	5.17	2.52	1.07
$k_{2(\text{Fe})}$ , $\text{h}^{-1}$	0.52	0.10	0.17
$k_{1(\text{Al})}$ , $\text{h}^{-1}$	2.72	0.38	0.98
$k_{2(\text{Al})}$ , $\text{h}^{-1}$	0.08	0.09	0.08

\*Vor-Ort-Austausch

## 4.6. Beladung gelöster HS mit Metallionen

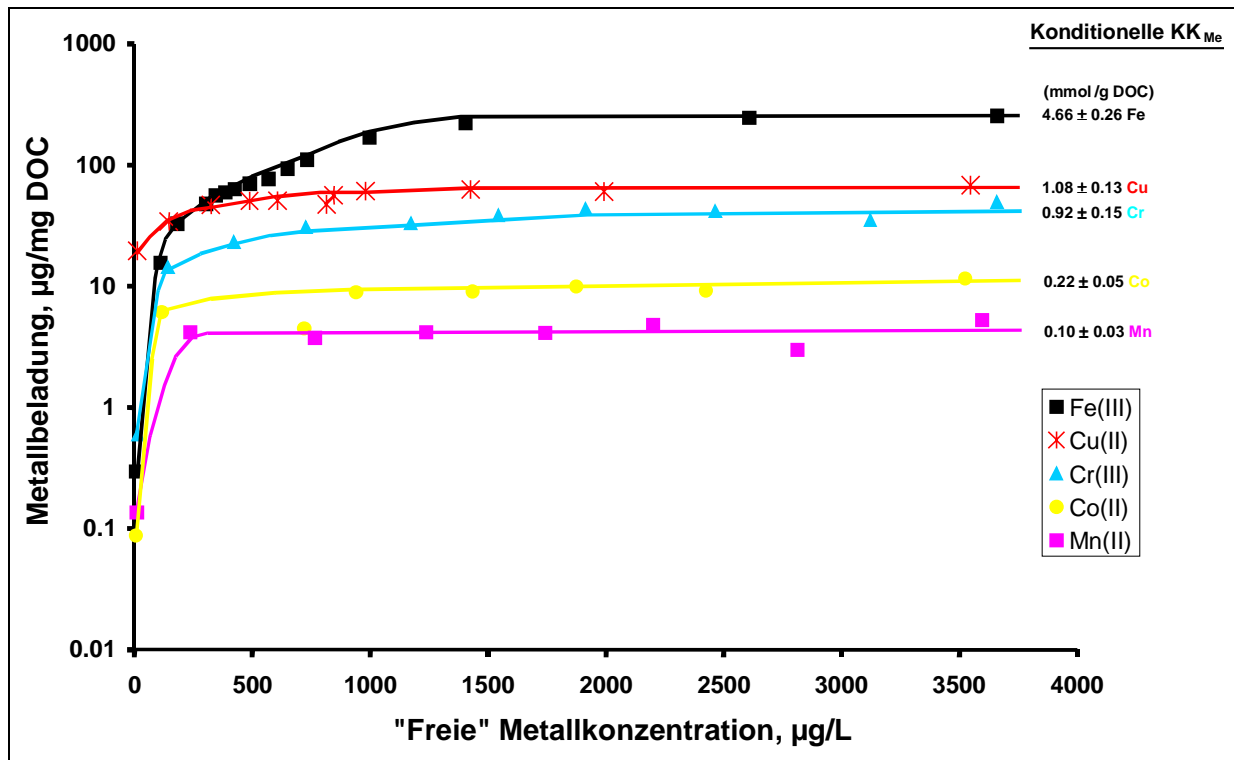
### 4.6.1. Konditionelle Komplexierungskapazitäten

Wie schon unter Punkt 3.6.1. erörtert, ist die konditionelle Komplexierungskapazität ein wichtiger operationeller Parameter für das Metallbindungsvermögen aquatischer HS. Sie wird in der Regel mit Hilfe der sogenannten Cu(II)-Komplexierungskapazität  $KK_{\text{Cu(II)}}$  charakterisiert. Die  $KK_{\text{Cu(II)}}$  gibt an, wieviel Cu(II) die betreffende HS-Probe maximal binden kann. Aus diesem Grund wurde die  $KK_{\text{Cu(II)}}$  in die Vor-Ort-Charakterisierung aquatischer HS mit einbezogen. Zunächst wurde das hierfür genutzte Metallbeladungsverfahren, kombiniert mit TF-UF, an einer aquatischen HS-Lösung erprobt. Hierzu diente die HS-Referenzprobe HO14-UF, die schrittweise mit Cu(II), Cr(III), Fe(III) bzw. Mn(II) beladen wurde.

Bei diesen Versuchen wurde jeweils eine 200 mL-HS-Probe (DOC: 25 mg/L HO14-UF, bei pH 5.0 und 0.05 M  $\text{NaNO}_3$ ) sukzessiv mit einem bestimmten Volumen einer schwach sauren 1g/L Cu(II)-, Co(II)-, Cr(III)-, Fe(III)- oder Mn(II)-Lösung versetzt. Jeweils nach zehn Minuten wurde von der metallbeladenen HS-Probe ein kleines Teilvolumen (ca. 1 mL) mittels TF-UF abfiltriert. Anschließend wurden Metall-Bestimmungen (FAAS, GFAAS) in den gesammelten UF-Penetraten durchgeführt. Aus der Differenz zwischen der vorgegebenen und der freien Metallkonzentration ergab sich die jeweilige Metallbeladung des gelösten HS. Die so erhaltenen HS-Beladungskurven und die daraus ableitbaren konditionellen KK für Cu(II), Co(II), Cr(III), Fe(III) bzw. Mn(II) sind in Abbildung 35 dargestellt. Wie ersichtlich ist, weist der untersuchte HS stark unterschiedliche KK gegenüber den einzelnen Metallionen auf. Sie reicht von 0.1 mmol/g DOC für Mn(II) bis 4.66 mmol/g DOC für Fe(III). Hierbei ist zu berücksichtigen, daß die vorliegende HS-Probe aufgrund ihrer Voranreicherung durch präparative UF ihre natürliche Metallbeladung behalten hatte, die in Konkurrenz zur artifizialen Beladung steht. Die so ermittelten KK-Werte sind deshalb als konditionell einzustufen. Wie hier exemplarisch gezeigt, ist die KK von HS stark abhängig vom betrachteten Schwermetallion und von konkurrierenden anderen Metallionen. Demzufolge ist

also das Metallbindungsvermögen gelöster HS durch ihre  $KK_{Cu(II)}$  nur unzureichend zu beschreiben.

Die relativ hohe Fe(III)-Kapazität ist wohl dadurch zu erklären, daß das hinzugegebene Fe(III) nicht nur an organische Liganden gebunden wurde, sondern vermutlich auch an anorganische Teilchen dieses HS.



**Abb. 35:** Konditionelle Metallbeladungskurven eines aquatischen Referenz-HS: HO14-UF (Probe: 25 mg/L DOC, 200 mL Probe, pH 5.0, 0.05 M NaNO<sub>3</sub>)

#### 4.6.2. Thermodynamische Stabilitätskonstanten

Die schrittweisen Beladungen aquatischer HS mit Metallionen können gleichzeitig zur Ermittlung konditioneller Stabilitätskonstanten  $K_f$  für den entstandenen HS-Metallkomplex genutzt werden.

Prinzipiell stellt jeder Punkt der erhaltenen Beladungskurven (Abb. 35) ein Komplexbildungsgleichgewicht dar, das nach Gleichung 13 (s. Seite 25) zur Berechnung der konditionellen Stabilitätskonstanten  $K_f$  dienen kann.

Tabelle 26 gibt die „freien“ Metallkonzentrationen und die daraus berechneten  $K_f$ -Werte verschiedener Metallionen bei natürlicher und 50 %-Beladung wieder. Wie ersichtlich ist, nimmt die konditionelle Stabilitätskonstante  $K_f$  für Co und Cu stark ab mit zunehmender Metallbeladung, nicht jedoch im Fall von Cr(III), Mn(II) und Fe(III) (Tab. 27). Hier nimmt die konditionelle Stabilitätskonstante mit der Beladung zu. Bei letztgenannten Ionen ist zu beachten, daß ihre natürliche Bindung an HS wahrscheinlich zu einem Gemisch

unterschiedlicher Oxidationsstufen führt (z.B. Fe(II,III), Cr(III,VI) und Mn(II,IV)), die aufgestockte Beladung jedoch nur aus Metallionen mit einheitlicher Oxidationsstufe (z.B. Fe(III), Cr(III) und Mn(II)) besteht. Die relativ niedrigen natürlichen Metallbeladungen dieses HS wurden mittels GFAAS und die artifiziellen mittels FAAS bestimmt. Tabelle 27 beschreibt eine stufenweise Fe(III)-Beladung von HO14-UF, wobei mit steigender Beladung die konditionelle Stabilitätskonstante  $K_f$  dieses HS um über eine Größenordnung zunimmt.

**Tab. 26:** Konditionelle Stabilitätskonstanten  $K_f$  von HO14-UF

Metallion	KK (mmol/g DOC)	Beladung (% von KK)	„freie“ Metallkonzentration (mol/L)	$K_f$ (L/mol)
Co(II)	0.22	0 <sup>a)b)</sup>	$9.32 \cdot 10^{-8}$	$3.58 \cdot 10^6$
		50 <sup>c)</sup>	$1.99 \cdot 10^{-6}$	$1.51 \cdot 10^6$
Cr(III)	0.92	0 <sup>a)b)</sup>	$2.87 \cdot 10^{-7}$	$4.39 \cdot 10^4$
		50 <sup>c)</sup>	$8.18 \cdot 10^{-6}$	$1.22 \cdot 10^5$
Cu(II)	4.66	0 <sup>b)</sup>	$1.10 \cdot 10^{-7}$	$3.62 \cdot 10^6$
		50 <sup>c)</sup>	$2.50 \cdot 10^{-6}$	$5.27 \cdot 10^5$
Mn(II)	0.10	0 <sup>a)b)</sup>	$1.55 \cdot 10^{-7}$	$1.55 \cdot 10^5$
		50 <sup>c)</sup>	$3.49 \cdot 10^{-6}$	$2.87 \cdot 10^5$

<sup>a)</sup>ET-AAS (s<sub>r</sub>: 5-10%), <sup>b)</sup>natürliche Beladung, <sup>c)</sup>artifizielle Beladung, F-AAS, (s<sub>r</sub>: 2-5%)

**Tab. 27:** Konditionelle Stabilitätskonstanten  $K_f$  von HO14-UF bei zunehmender Fe(III)-Beladung

Metallion	KK (mmol/g DOC)	Beladung (% von KK)	„freie“ Fe(III)-Konzentration (mol/L)	$K_f$ (L/mol)
Fe(III)	4.66	0 <sup>a)b)</sup>	$1.91 \cdot 10^{-7}$	$8.69 \cdot 10^3$
		25 <sup>c)</sup>	$7.63 \cdot 10^{-6}$	$4.19 \cdot 10^4$
		50 <sup>c)</sup>	$1.46 \cdot 10^{-5}$	$6.81 \cdot 10^4$
		75 <sup>c)</sup>	$1.92 \cdot 10^{-5}$	$1.56 \cdot 10^5$
		98 <sup>c)</sup>	$6.55 \cdot 10^{-5}$	$7.40 \cdot 10^5$

<sup>a)</sup>ET-AAS (s<sub>r</sub>: 5-10%), <sup>b)</sup>natürliche Beladung, <sup>c)</sup>artifizielle Beladung, F-AAS, (s<sub>r</sub>: 2-5%)

## 4.7. Metall-Austausch an Huminstoff-Metallspezies

Die artifizielle Vor-Ort-Beladung aquatischer HS mit Metallionen führt nicht nur zu konditionellen Komplexierungsgleichgewichten, sie kann gleichzeitig auch zur Charakterisierung von Austauschprozessen zwischen den im Gewässer bereits vorliegenden HS-Metallspezies (natürliche Spezies) und zusätzlich eingetragenen Metallionen, z.B. Cu(II), genutzt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Cu(II)-Ionen als stark mit Me an HS-Liganden konkurrierende Metallionen genutzt, im Sinne von Gleichung 47:

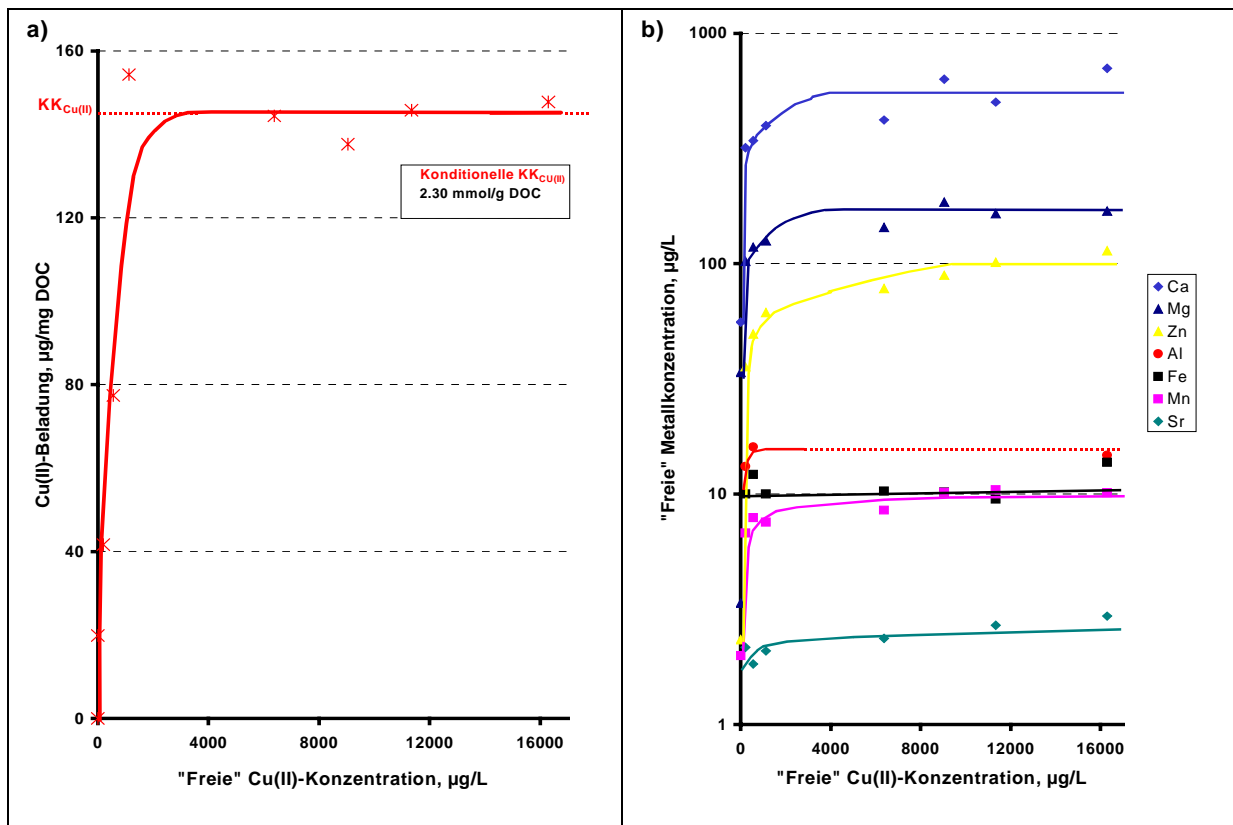


Die durch Austauschreaktionen entstandenen Spezies (HS-Cu und Me) lassen sich vor Ort in einfacher Weise durch TF-UF (n.m.w.cut-off: 1 kDa) differenzieren. Die Metallbestimmungen (z.B. ICP-OES, GFAAS) erfolgen später im Labor.

### 4.7.1. Vor-Ort-Austausch mit Cu(II)-Ionen

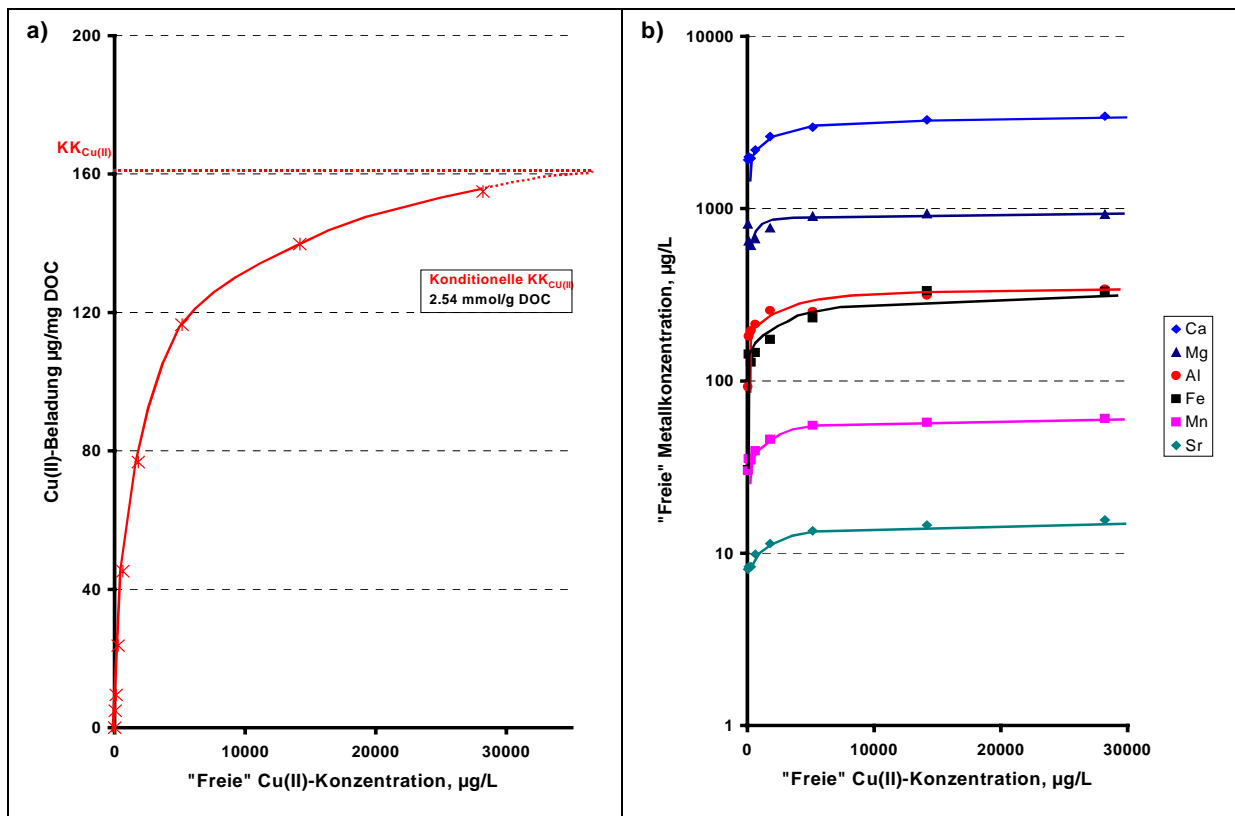
#### *Austauschreaktionen*

Der Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit konkurrierenden Cu(II)-Ionen erfolgte an den bereits beschriebenen Referenzgewässern HO, VM und AW. Hierzu dienten je 200 mL Wasserproben, die bei ihrem natürlichen pH-Wert durch ein 0.45 µm-Membranfilter vorfiltriert, sukzessiv mit Cu(II)-Ionen beladen und mittels TF-UF, wie beschrieben, der Trennung in freie und gebundene Metallionen unterzogen wurden. Ein typisches Beispiel einer solchen Vor-Ort-Cu(II)-Beladung ist in Abbildung 36 a für die Referenzwasserprobe HO16 dargestellt, aus der sich eine konditionelle  $KK_{\text{Cu(II)}}$  von 2.30 mmol/g DOC für dieses Moorwasser ergibt. Gleichzeitig unterliegen die vorliegenden natürlichen Metallspezies, wie in Abbildung 36 b dargestellt, einem zunehmenden Austausch durch Cu(II)-Ionen. Bei stark erhöhter Cu(II)-Konzentration werden schließlich bestimmte Grenzwerte für die austauschfähigen Metallionen, z.B. von Al, Fe, Mn, Zn, Ca, Mg und Sr in HO16, erreicht.

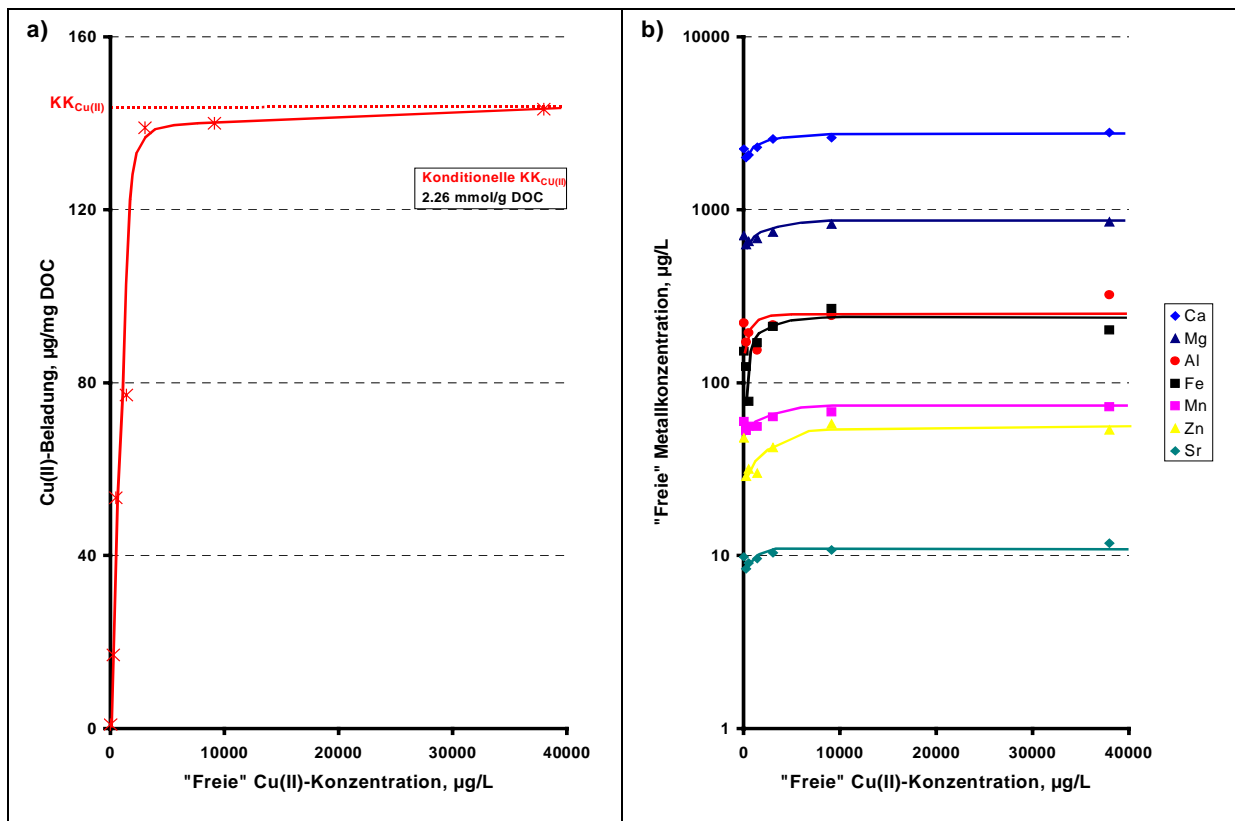


**Abb. 36:** Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit Cu(II)-Ionen  
 (a: Ermittlung der  $KK_{Cu(II)}$ ; Probe: **HO16**, Gleichgewichte nach 10 min)  
 (b: Metallaustausch mit Cu(II); Probe: **HO16**,  $KK/Cu \approx 1/1$ )

In gleicher Weise sind in Abbildung 37 die ermittelten konditionellen  $KK_{Cu(II)}$  (37 a) bzw. die Metallaustauschkurven (37 b) von VM8 dargestellt. Die konditionelle  $KK_{Cu(II)}$  hat in diesem Fall bei 2.54 mmol/g DOC noch nicht ganz ihren maximalen Wert erreicht. Der Metallaustausch erreicht bereits bei einer „freien“ Cu(II)-Konzentration von 15 mg/L weitgehend sein Maximum. Die Abbildung 38 faßt die Ergebnisse des Vor-Ort-Cu(II)-Austausches an AW3 zusammen. Wie ersichtlich ist, wurden auch in diesem HS-haltigen Waldbach ähnliche konditionelle  $KK_{Cu(II)}$ - bzw. Metallaustausch-Werte ermittelt wie in den beiden anderen Referenzproben. Bedingt durch relativ niedrige pH-Werte von  $< 4$  liegt in VM8 und AW3 ein großer Teil der Metallspezies schon in Form freier Ionen vor, die bereits ohne Cu(II)-Zusatz die eingesetzte UF-Membran durchdringen können.



**Abb. 37:** Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit Cu(II)-Ionen  
 (a: Ermittlung der  $KK_{Cu(II)}$ ; Probe: **VM8**, Gleichgewichte nach 10 min)  
 (b: Metallaustausch mit Cu(II); Probe: **VM8**,  $KK/Cu \approx 1/1$ )



**Abb. 38:** Natürliche HS-Metallspezies: Vor-Ort-Austausch mit Cu(II)-Ionen  
 (a: Ermittlung der  $KK_{Cu(II)}$ ; Probe: **AW3**, Gleichgewicht nach 10 min)  
 (b: Metallaustausch mit Cu(II); Probe: **AW3**,  $KK/Cu \approx 1/1$ )

Eine Übersicht über den Cu(II)-Austausch an natürlichen HS-Metallspezies in verschiedenen Proben gibt die Tabelle 28.

**Tab. 28:** Cu(II)-Austausch an natürlichen HS-Metallspezies in verschiedenen Referenzproben

Element	VM7	VM8	VM9	HO16	HO17	AW3	AW4
<b>Al</b> -gesamt, µg/L	650	714	732	103	80	490	550
Cu(II)-labil, %	57 ± 5	48 ± 5	33 ± 2	16 ± 2	69 ± 5	50 ± 7	99 ± 2
<b>Fe</b> -gesamt, µg/L	1657	1611	2250	280	217	877	819
Cu(II)-labil, %	9 ± 4	20 ± 2	2 ± 1	5 ± 2	23 ± 3	27 ± 10	85 ± 3
<b>Mn</b> -gesamt, µg/L	72	64	80	9	6	75	115
Cu(II)-labil, %	98 ± 4	94 ± 4	9 ± 2	100 ± 10	100 ± 2	95 ± 4	99 ± 2
<b>Zn</b> -gesamt, µg/L	108	84	85	111	81	53	96
Cu(II)-labil, %	71 ± 2	*	19 ± 3	90 ± 11	99 ± 2	99 ± 2	94 ± 2
<b>Mg</b> -gesamt, µg/L	912	820	1162	166	99	929	1625
Cu(II)-labil, %	94 ± 3	100 ± 3	10 ± 5	100 ± 8	100 ± 1	92 ± 2	96 ± 1
<b>Sr</b> -gesamt, µg/L	16	14	17	3	2	13	29
Cu(II)-labil, %	90 ± 2	100 ± 4	8 ± 4	99 ± 8	100 ± 1	91 ± 2	93 ± 2
<b>Ca</b> -gesamt, µg/L	3093	3150	3054	479	248	2582	3393
Cu(II)-labil, %	82 ± 2	100 ± 6	9 ± 5	100 ± 21	100 ± 2	100 ± 6	100 ± 3

KK/Cu $\approx$ 1/1; \*nicht auswertbar

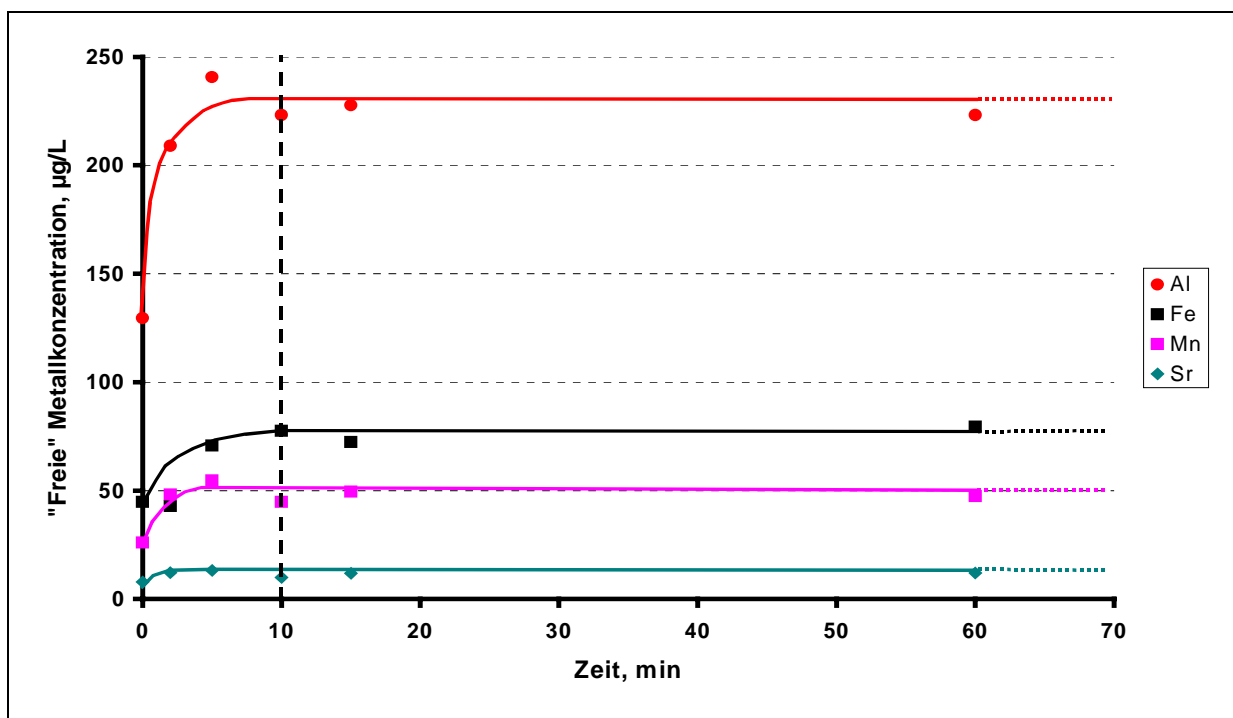
Das Austauschvermögen der untersuchten aquatischen Metallspezies gegenüber Cu(II)-Ionen fällt recht unterschiedlich aus. So erweisen sich Ca, Mg, Mn, Sr und Zn in den DOC-reichen Wasserproben weitgehend als austauschfähig, abgesehen von VM9 mit einem großen Anteil an hochmolekularen Spezies. Die Austauschfähigkeit natürlicher Al- bzw. Fe-Spezies unterliegt offensichtlich einer starken Schwankungsbreite zwischen 16 und 99 % bzw. zwischen 2 und 85 %, auch bei gleicher Probenherkunft (vgl. VM7-9). Damit liegt die Verfügbarkeit der natürlichen HS-Metallspezies in Gewässern gegenüber Cu(II) durchweg niedriger als die gegenüber EDTA (s. Tab. 22). Dennoch ist der Austausch aquatischer HS-Metallspezies mit konkurrierenden Schwermetallionen als wichtiger Transformationsmechanismus in Gewässern zu betrachten. Offen ist bisher die Frage der Austauschkinetik.



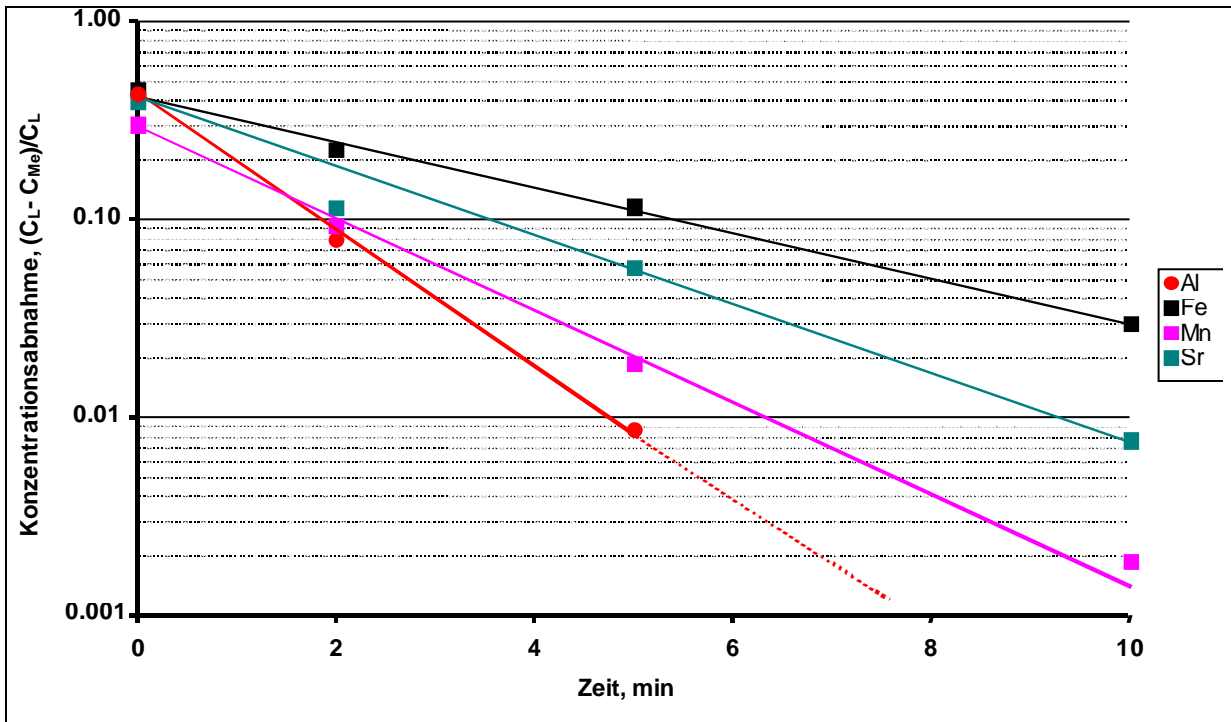
## Kinetik

Die Kinetik des Metallaustausches in aquatischen HS-Metallspezies wurde bisher kaum untersucht, abgesehen von vereinzelt Isotopenaustausch-Arbeiten [123]. Deshalb wurde der Cu(II)-Austausch von natürlichen Metallspezies in einer HS-reichen Wasserprobe (VM8) als Funktion der Zeit verfolgt. Hierbei wurde ein  $KK_{\text{Cu(II)}}$ /Cu(II)-Verhältnis von 2/1 gewählt.

Der Verlauf dieses Metallaustausches ist in Abbildung 39 dargestellt. Wie ersichtlich, stellen sich die Austauschgleichgewichte zwischen den untersuchten natürlichen HS-Metallspezies (z.B. Al, Fe, Mn, Sr) und den Cu(II)-Ionen innerhalb von zehn Minuten weitgehend ein. Deshalb wurde bei den anderen Austauschversuchen (s. Abb. 36-38) nach jeder Cu(II)-Zugabe mindestens zehn Minuten gewartet, bevor die entstandenen Spezies durch TF-UF voneinander getrennt wurden. Aus der logarithmischen Auftragung des Cu(II)-Austausches als Funktion der Zeit (Abb. 40), in Anlehnung an Gleichung 43, ergibt sich eine Reaktion erster Ordnung mit Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  von etwa ein bis zwei Minuten, je nach Element. Die dem Cu(II)-Austausch zugänglichen HS-Metallspezies reagieren also mit den zugesetzten Cu(II)-Ionen um Größenordnungen schneller als mit EDTA. Möglicherweise werden Kationen wie  $\text{Cu}^{2+}$  von negativ geladenen HS-Polyelektrolyten wesentlich schneller aufgenommen bzw. ausgetauscht als negativ geladene Chelat-Liganden wie das EDTA. Es bleibt jedoch offen, ob der Cu(II)-Austausch nach erster Ordnung oder, aufgrund der hohen Cu(II)-Konzentration, nach pseudo-erster Ordnung verläuft.

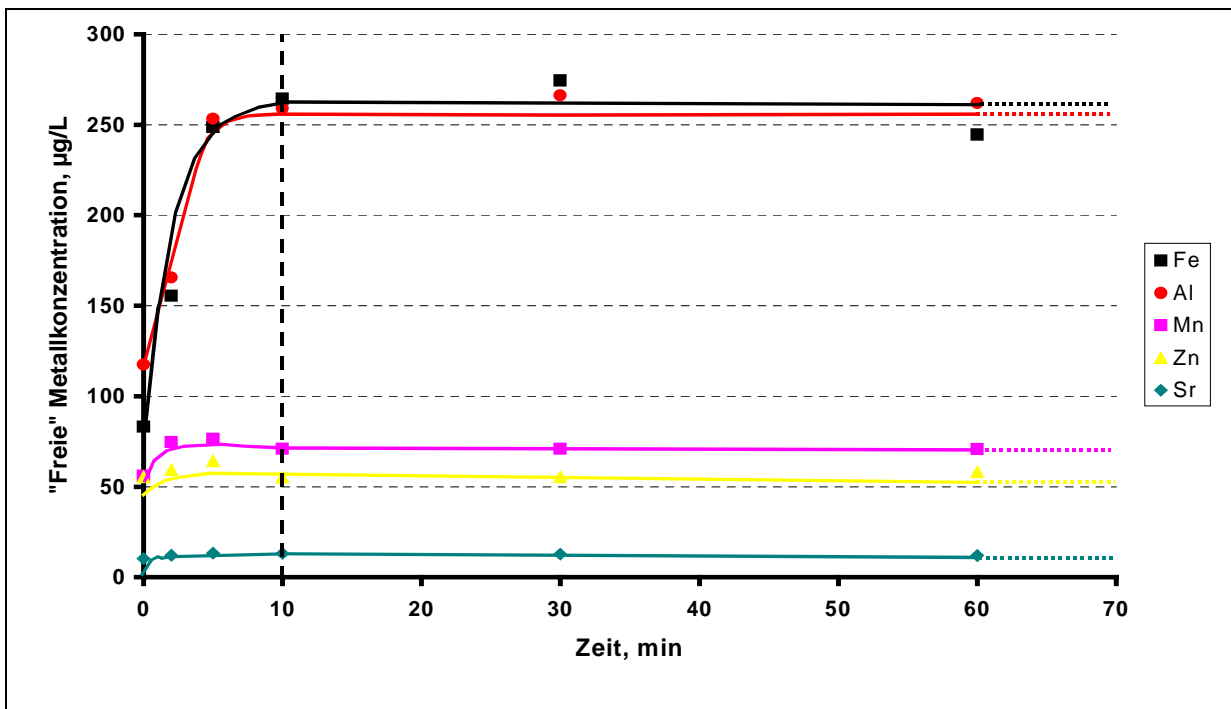


**Abb. 39:** Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen: Zeitabhängigkeit (Probe: VM8,  $KK/\text{Cu(II)} \approx 2/1$ )

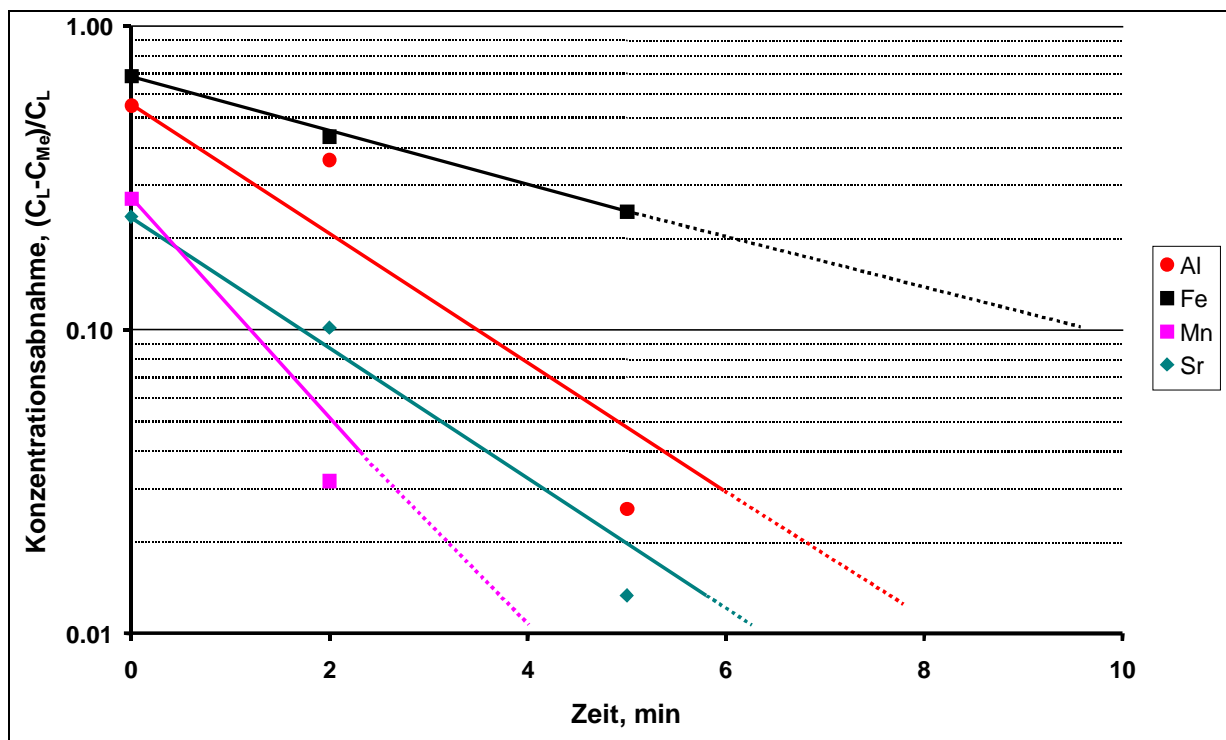


**Abb. 40:** Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen: Kinetik  
 ( $C_L$ : Konzentration an austauschfähigen Metallspezies, Probe: **VM8**,  $KK/Cu(II) \approx 2/1$ ,  
 Punkte berechnet aus Abb. 39))

Ein ähnliches Bild für die Kinetik des Cu(II)-Austausches ergab sich im Fall der Wasserprobe AW3, wie den in Abbildung 41 bzw. 42 dargestellten Ergebnissen zu entnehmen ist.



**Abb. 41:** Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen: Zeitabhängigkeit  
 (Probe: **AW3**,  $KK/Cu(II) \approx 1/1$ )



**Abb. 42:** Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen: Kinetik  
 ( $C_L$ : Konzentration an austauschfähigen Metallspezies, Probe: **AW3**,  $KK/Cu(II) \approx 1/1$ ,  
 Punkte berechnet aus Abb. 41)

Wie ersichtlich, stellen sich die Austauschgleichgewichte zwischen Cu(II)-Ionen und den Mn-, Sr- und Zn-Spezies in dieser Wasserprobe bereits nach ca. fünf Minuten ein. Die formalen Geschwindigkeitskonstanten des Metall/Cu(II)-Austausches in den Proben VM8, AW3 und HO17 sind in Tabelle 29 zusammengefasst.

**Tab. 29:** Geschwindigkeitskonstanten  $k_i$  des Metall-/Cu(II)-Austausches in den Wasserproben VM8, AW3 und HO17

Element	VM8 $k_i, h^{-1}$	AW3 $k_i, h^{-1}$	HO17 $k_i, h^{-1}$
Al	46.1	29.1	31.5
Fe	16.5	12.4	49.6
Mn	32.5	54.6	70.4
Sr	23.5	29.2	26.2
Zn	*	56.3	18.9

Vor-Ort-Austausch; VM8 und HO17:  $KK/Cu \approx 2/1$ , AW3:  $KK/Cu \approx 1/1$ , \* nicht auswertbar

### **Austauschkonstanten**

Prinzipiell können HS und Metallionen in Gewässern eine Vielzahl von Komplexbildungsgleichgewichten eingehen. Die Austauschgleichgewichte mit einem zusätzlichen, stark konkurrierenden Kation, z.B. Cu(II), können dann, wie schon erwähnt, mit folgender Gleichung allgemein beschrieben werden:



Für die vorhandenen natürlichen Metallbeladungen Me in HS lassen sich nach dem allgemeinen Massenwirkungsgesetz relative Austauschkonstanten  $K_a$  bestimmen:

$$K_a = \frac{[\text{HS - Cu}] \cdot [\text{Me}]}{[\text{Cu(II)}] \cdot [\text{HS - Me}]} \quad (49)$$

Die Austauschkonstanten  $K_a$  geben also an, wie stabil der gebildete HS-Cu-Komplex ist, bezogen auf die Stabilität der vorliegenden austauschfähigen HS-Me. Solche Austauschkonstanten  $K_a$  für natürliche HS-Me lassen sich in einfacher Weise ermitteln, wenn die „freien“ und gebundenen Metallfraktionen vor Ort mittels TF-UF differenziert und ihre Konzentrationen durch Atomspektrometrie im Labor quantifiziert werden. Die so ermittelten Austauschgleichgewichte natürlicher HS-Me mit zugesetzten Cu(II)-Ionen sind in den Abbildungen 43, 44, 45 und 46 für verschiedene Wasserproben graphisch dargestellt als Funktion  $[\text{Me}]/[\text{HS-Me}]$  gegen  $[\text{Cu(II)}]/[\text{HS-Cu}]$ . Die Austauschkonstanten  $K_a$  erhält man aus den Steigungen der Funktionen. Wenn sich allerdings die untersuchten Metallspezies HS-Me, auch bei hohem Cu(II)-Überschuß, zu einem erheblichen Teil als austauschiner erweisen, ist zur Korrektur der labile Anteil  $[\text{HS-Me}]_{\text{lab.}}$  an Stelle von  $[\text{HS-Me}]$  in Gleichung 49 einzufügen.

Die Austauschkonstanten  $K_a$  verschiedener HS-Me, bezogen auf Cu(II), sind in Abbildung 43 für die Wasserprobe HO16 dargestellt. Für Ca, Mg, Mn und Zn sind die  $K_a$ -Werte deutlich größer als eins. Dies bedeutet, daß die betreffenden Metallionen von HS im Gleichgewicht wesentlich schwächer gebunden werden als das zugesetzte Cu(II). Für Al und Fe hingegen betragen die  $K_a$ -Werte  $\leq 0.01$ . Demnach weisen die Al- und Fe-Spezies dieses HS eine hundertfach höhere Stabilität auf als die konkurrierenden HS-Cu-Komplexe. Wie ersichtlich, liegt die relative Standardabweichung der  $K_a$ -Werte, ermittelt aus der Abweichung der Meßpunkte von der Ausgleichsgeraden, im Bereich von 2-10 %. Abbildung 44 zeigt die Gleichgewichte und Austauschkonstanten für die VM7-Probe. Auffallend ist das Auftreten von offenbar zwei Austauschkonstanten,  $K_{a1}$  und  $K_{a2}$ , die für Ca, Mg, Sr und Mn zu beobachten sind. Dies bedeutet, daß natürliche HS-Komplexe dieser Metallionen bei einem niedrigen  $[\text{Cu(II)}]/[\text{HS-Cu}]$ -Verhältnis weniger vom Cu(II) beinflusst werden als bei höheren. Auch in diesem Fall sind die  $K_a$ -Werte für Al und Fe wesentlich kleiner als eins. Abbildung 45

gibt die Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$  für die VM8-Probe wieder. Im Gegensatz zu VM7 ergeben sich hier keine zwei Austauschkonstanten. Darüber hinaus fallen die  $K_a$ -Werte für Ca, Mg und Sr wesentlich höher aus als in VM7.

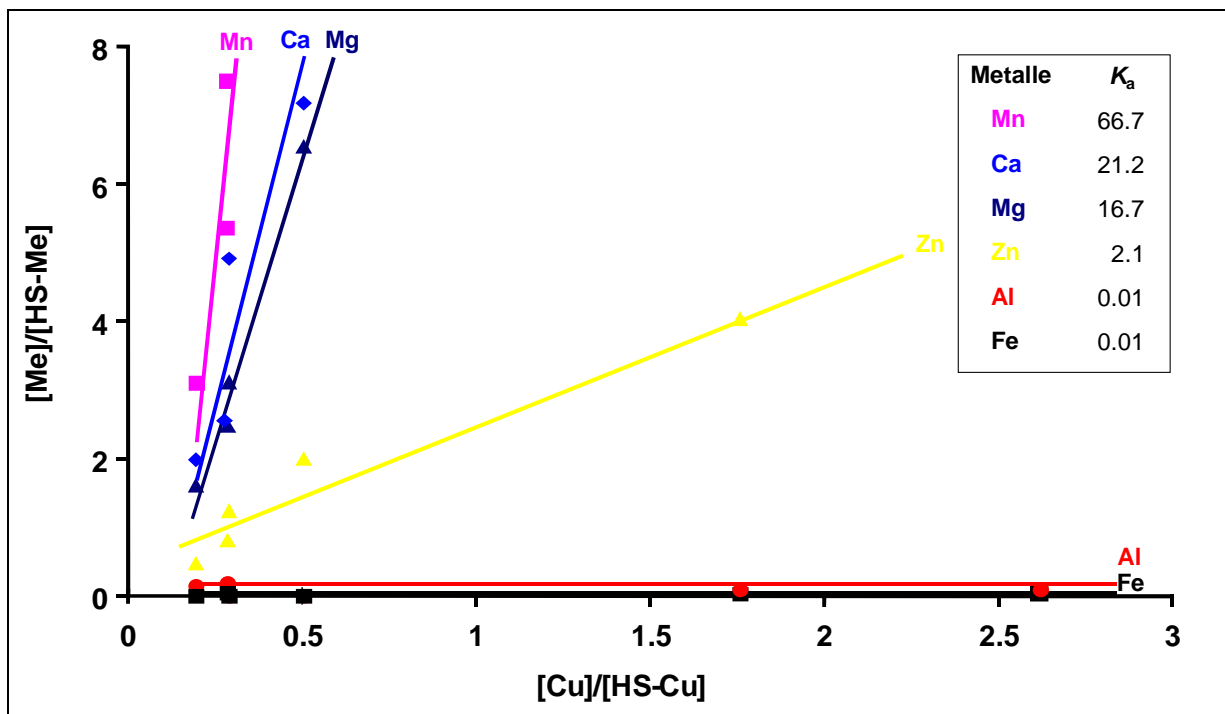


Abb. 43: Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen; Probe: HO16, Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$

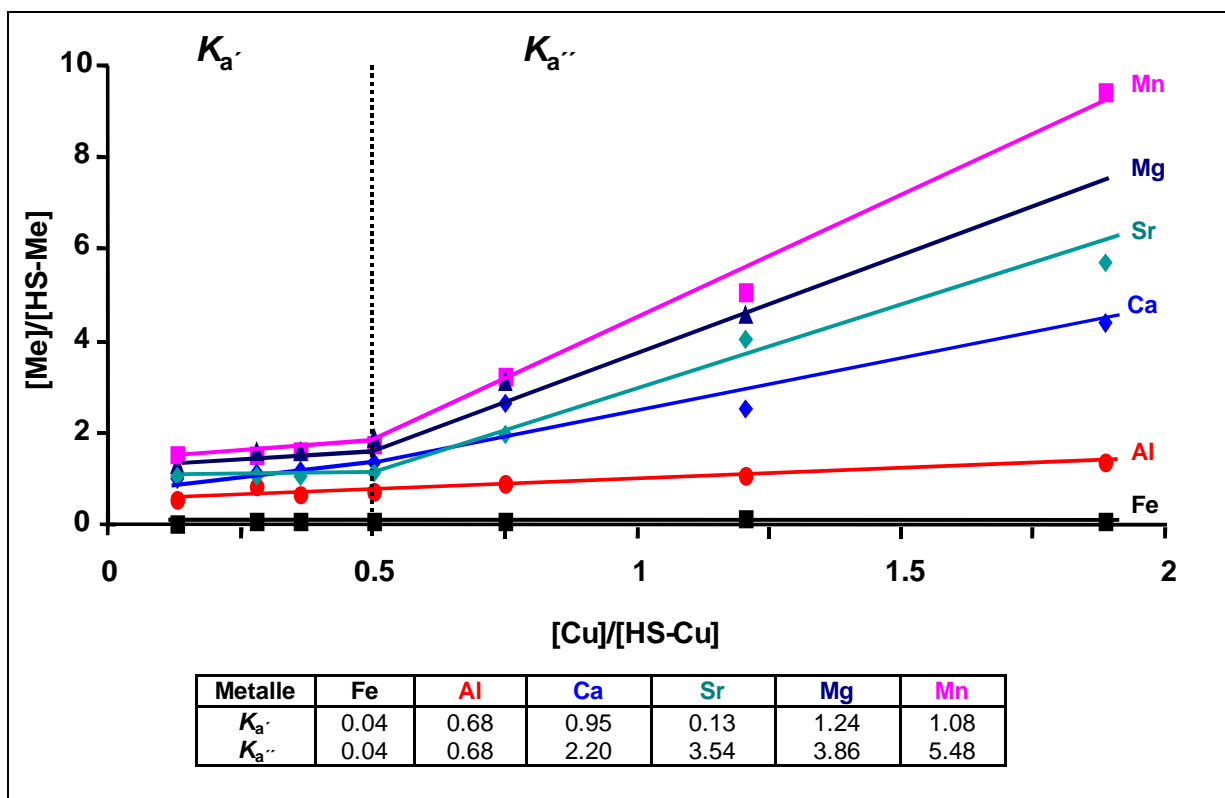


Abb. 44: Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen; Probe: VM7, Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$

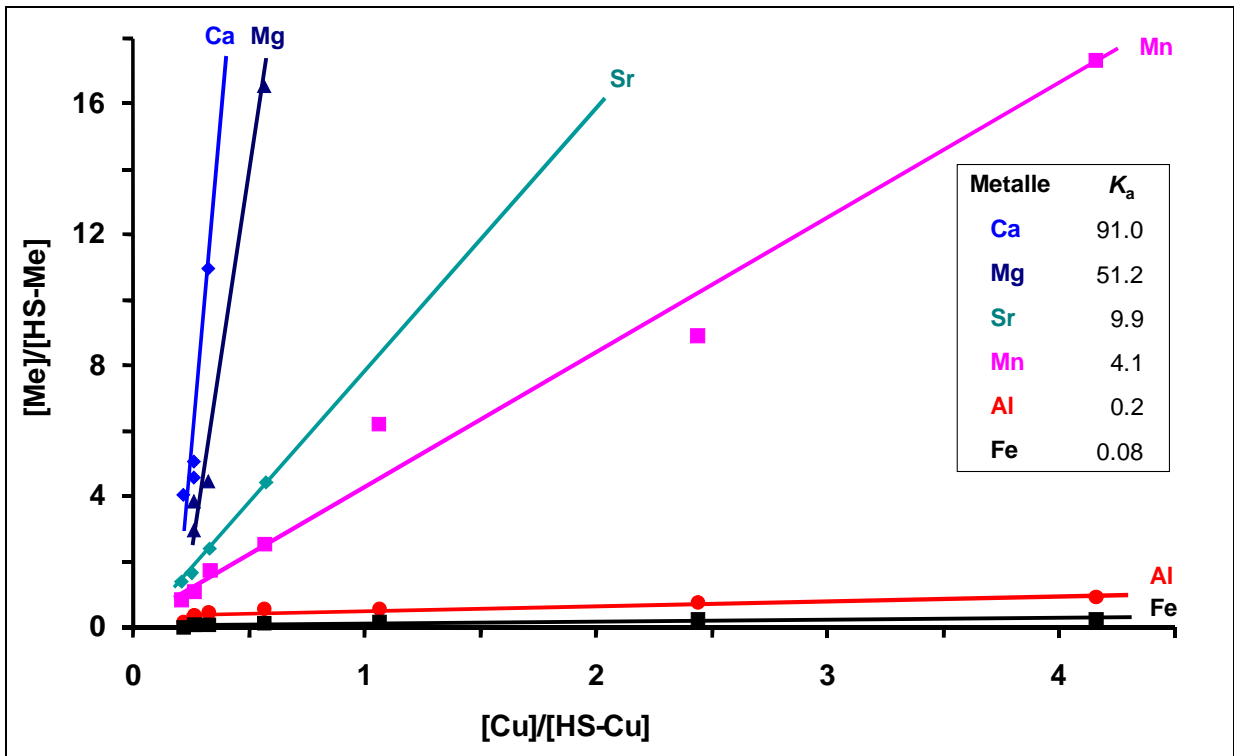


Abb. 45: Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen; Probe: VM8, Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$

Abbildung 46 zeigt die Austauschkonstanten  $K_a$  für AW3. Auffallend sind die vergleichsweise niedrigen  $K_a$ -Werte, insbesondere für Mn(II) und die Erdalkali-Ionen. Die  $K_a$ -Werte für den Metallaustausch in allen untersuchten Wasserproben sind in Tabelle 30 zusammengefasst.

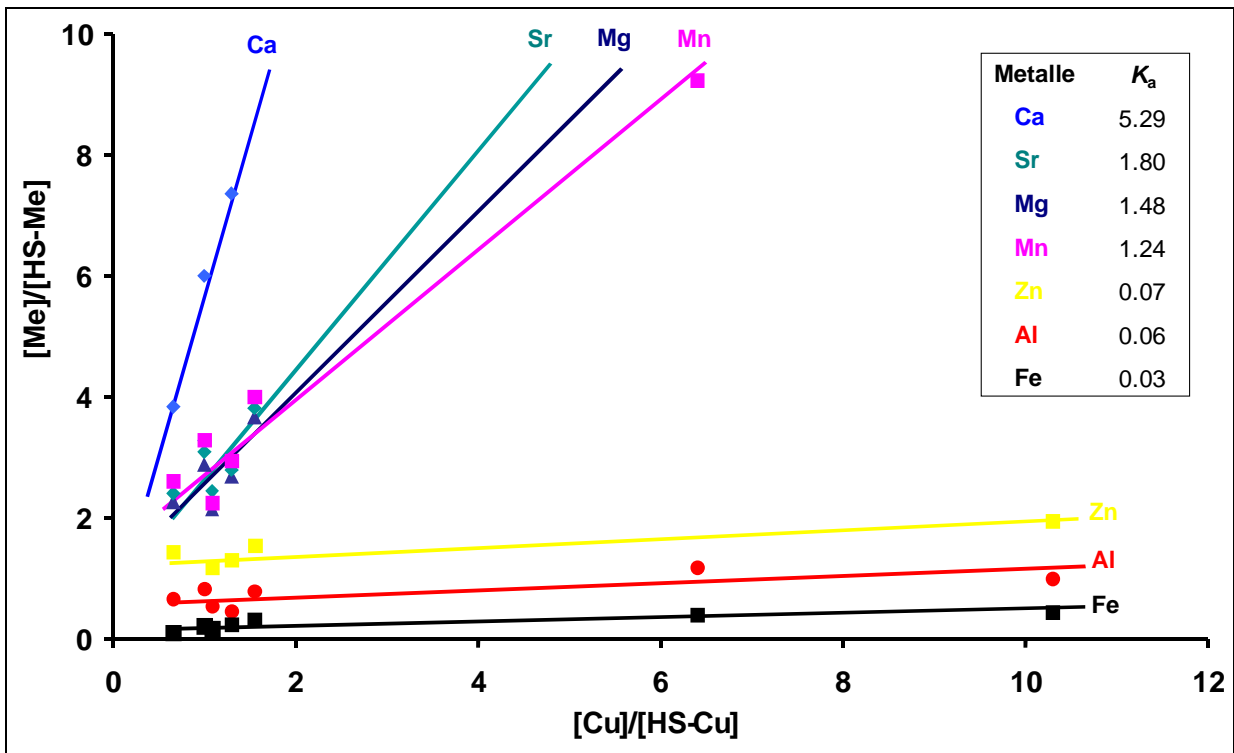


Abb. 46: Vor-Ort-Austausch natürlicher HS-Metallspezies mit Cu(II)-Ionen; Probe: AW3, Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$

**Tab. 30:** Austauschkonstanten  $K_a$  für verschiedene Wasserproben

Element	VM7		VM8	VM9	HO16	HO17	AW3	AW4
	$K_a'$	$K_a''$						
Al	0.68	0.68	0.18	$\leq 0.01$	$\leq 0.01$	0.08	0.06	0.08
Fe	0.04	0.04	0.08	$\leq 0.01$	$\leq 0.01$	0.02	0.03	0.03
Mn	1.08	5.48	4.13	$\leq 0.01$	66.7	23.8	1.24	4.23
Zn	*	*	*	$\leq 0.01$	2.17	*	0.07	0.12
Mg	1.24	3.86	51.2	$\leq 0.01$	16.7	33.3	1.48	1.58
Sr	0.13	3.54	9.86	$\leq 0.01$	*	*	1.80	1.32
Ca	0.95	2.20	91.0	0.02	21.2	66.6	5.29	3.76

Vor-Ort-Austausch, \*nicht auswertbar

Wie ersichtlich, hält sich die natürliche Schwankungsbreite der  $K_a$ -Werte für den Al- bzw. Fe-Austausch in recht engen Grenzen, abgesehen von Al in VM7. Auffällig sind die starken Schwankungen der Austauschkonstanten  $K_a$  im Fall von Mn bzw. der Erdalkali-Ionen. Die teilweise sehr niedrigen  $K_a$ -Werte von  $<1$  (z.B. VM7) korrelieren auffällig mit sehr geringen Elektrolytgehalten in diesen Proben. Möglicherweise werden hier die Metallionen von HS weniger in Form von Komplexen gebunden sondern vielmehr als Gegenionen anionischer Liganden zurückgehalten. In diesem Fall wäre ihnen eine Penetration durch die UF-Membran verwehrt.

### ***Konkurrierende Metallbeladungsgleichgewichte an HS***

Gelöste HS können als polyfunktionelle Liganden mit vielen aquatisch relevanten Metallionen in Komplexierungsgleichgewichte eintreten. Die Reihe der diesbezüglich untersuchten Metallionen reicht von Be(II) [124] bis hin zu den Aktinidenelementen [125]. Derartige HS-Metallkomplexierungsgleichgewichte wurden bisher meist nur in vereinfachten Lösungssystemen mit isolierten HS und Ionen eines einzelnen Metalls untersucht. Naturbelassene aquatische HS hingegen sind makromolekulare Liganden, die im Gewässer mit den dort enthaltenen Metallionen wahrscheinlich eine Vielzahl von Gleichgewichten eingehen. Bisher gibt es in der Literatur praktisch keine Hinweise darauf, inwieweit diese Gleichgewichte sich gegenseitig beeinflussen oder ob sie weitgehend unabhängig voneinander koexistieren. Aus den vorangegangenen Austauschversuchen zwischen natürlichen HS-Metallspezies und Cu(II)-Ionen hatte sich nur die Information ergeben, daß stark um HS-Liganden

konkurrierende Metallionen wie das Cu(II) in andere HS-Metallaustauschgleichgewichte eingreifen, wenn sie selbst im Überschuß vorliegen.

Deshalb wurde auch die Frage nach untereinander konkurrierenden Austauschgleichgewichten der HS-Metallspezies in Gewässern in ihre Vor-Ort-Charakterisierung mit einbezogen. Zu diesem Zweck wurden frisch geschöpfte 0.45 µm-filtrierte Wasserproben sukzessiv mit relativ geringen Konzentrationen einer Mischung von wasserchemisch relevanten Metallionen (je 0.5 bis 5.0 µmol/L Al(III), Cd(II), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II)) versetzt, die entstandenen komplexen Spezies Me-HS mittels TF-UF vor Ort von freien Ionen Me getrennt und die Fraktion mittels ICP-OES im Labor analysiert. Die Konzentrationszugabe von 0.5 bis 5.0 µmol/L wurde so gewählt, daß weithin natürliche Bedingungen vorlagen und keine Fällungsprobleme zu erwarten waren. Typische „Multiionen“-Komplexierungsgleichgewichte, die sich auf diese Weise in HS-haltigen Wasserproben vor Ort einstellten, sind in den Abbildungen 47 und 48 dargestellt. In der hier gewählten Darstellung wurden die [Me]/[Me-HS]-Verhältnisse als Funktion der jeweils zugegebenen Konzentration der Metalle aufgetragen. Im Falle der relativ DOC-reichen Wasserprobe VM7 führen die summarischen Metallionen-Beladungen des vorliegenden HS zu Komplexierungsgleichgewichten, für welche die Verhältnisse [Me]/[HS-Me] im Zugabebereich von 0.5 bis 5.0 µmol/L weitgehend konstant zueinander bleiben. Offenbar treten bei der zunehmenden Beladung dieses HS, die deutlich unter seiner formalen Ligandenkonzentration bleibt (Metallbeladung bis zu 30 % der  $KK_{Cu(II)}$ ), keine untereinander konkurrierenden Gleichgewichte auf. Dies gilt auch für die nicht zugegebenen Erdalkalitionen in ihren ursprünglich vorhandenen HS-Komplexen. Anders sieht es im untersten Konzentrationsbereich bis 0.5 µmol/L aus, hier herrscht deutliche Konkurrenz unter den Metallionen, Fe und Zn ausgenommen. Diese Konkurrenz kann man dadurch erklären, daß eine Mischung verschiedener Ligandenarten vorliegt. Die am besten koordinierenden Liganden werden vorzugsweise von „starken“ Metallionen besetzt, wie z.B. durch Fe(III). Im Falle der DOC-ärmeren Probe HO17 werden die Metalle, mit Ausnahme von Al, Fe und Pb, deutlich schwächer gebunden mit zunehmender Metallkonzentration. Bei der Metallzugabe von 5 µmol/L ist die  $KK_{Cu(II)}$  dieser Wasserprobe bereits zu etwa 90 % beladen.



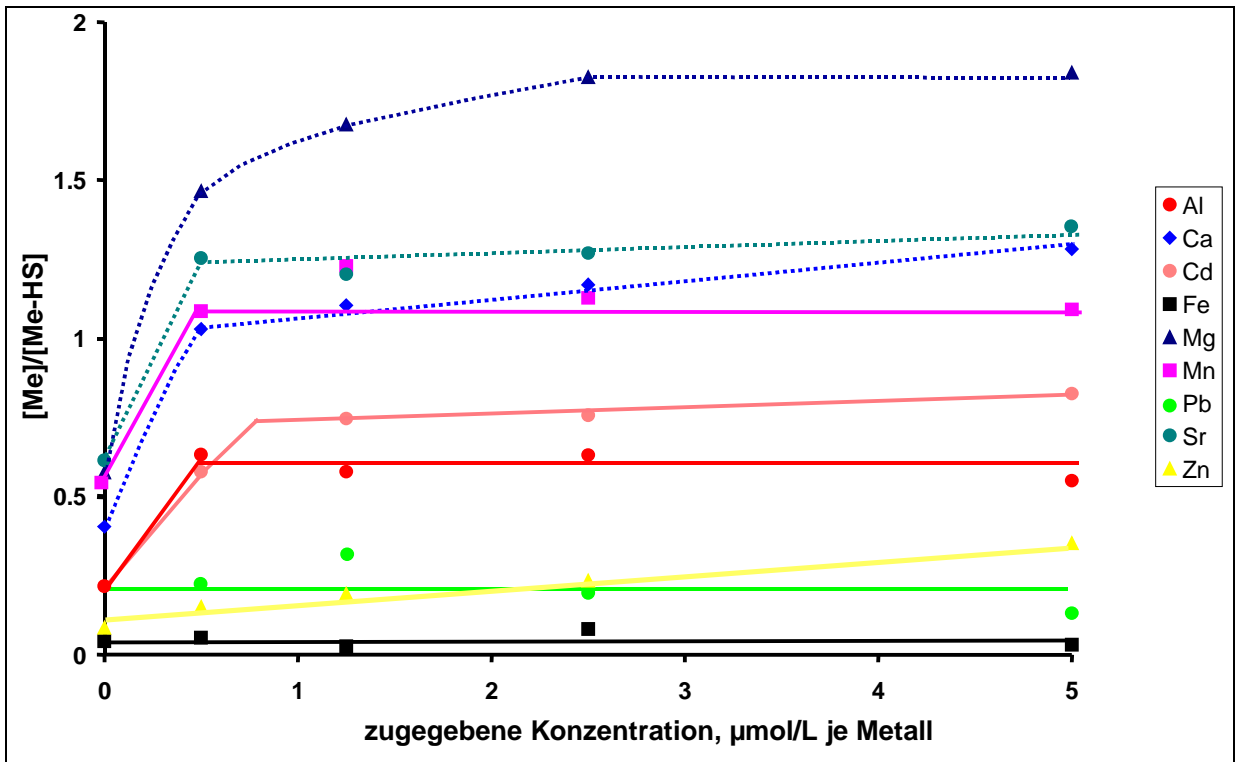


Abb. 47: Konkurrierende Metallbeladungsgleichgewichte in VM7, Ca, Mg und Sr: Vorhandene Spezies, Cu und Ni nicht auswertbar wegen zu großer Streuungen

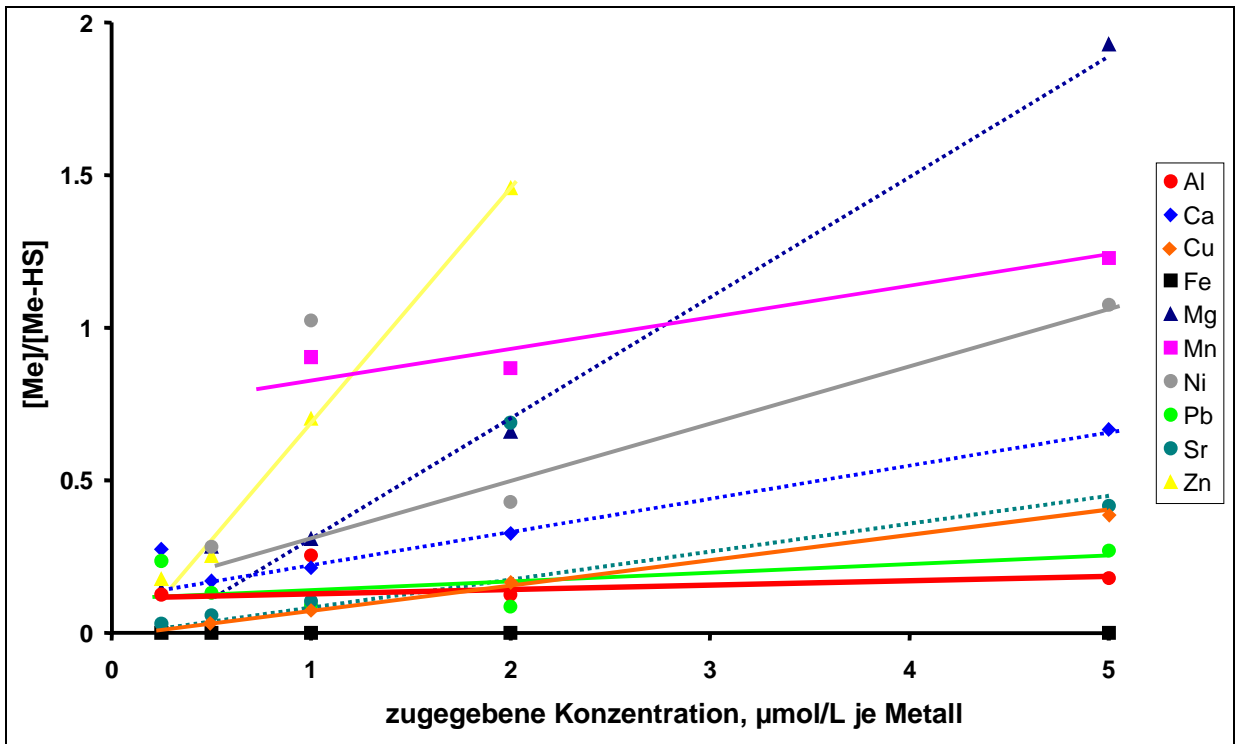


Abb. 48: Konkurrierende Metallbeladungsgleichgewichte in HO17, Ca, Mg und Sr: Vorhandene Spezies, Cd nicht auswertbar wegen zu großer Streuungen

#### 4.7.2. Cu(II)-Austausch an natürlichen, vorangereicherten und artifiziellen HS-Metallspezies

Diese Untersuchung sollte aufzeigen, ob sich natürliche HS-Metallspezies von angereicherten bzw. artifiziellen unterscheiden, wenn man sie einem konkurrierenden Cu(II)-Austausch aussetzt. Hierzu diente ein vor Ort durchgeführter Cu(II)-Austausch in der Referenzprobe HO17, verglichen mit einem Cu(II)-Austausch an den vorangereicherten Metallspezies in HO17-UF. Die artifiziellen Metallspezies in HO17-XAD 8, die ähnlich wie für den EDTA-Austausch gewonnen wurden, wurden ebenfalls einem Cu(II)-Austausch unterzogen. Der Cu(II)-Austausch an HO17-UF und an HO17-XAD 8 wurde jedoch nach Rückverdünnung auf 20 mg/L DOC bei pH 4.2 unter standardisierten Bedingungen durchgeführt. Es wurde ein Verhältnis  $KK_{Cu(II)}/Cu(II)$  von eins gewählt.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 31 einander gegenübergestellt. Auffallend ist die relativ geringe Cu(II)-Labilität der Fe-Spezies, wobei die Referenzprobe HO17 und ihr UF-Konzentrat ein ähnliches Ergebnis aufwiesen. Die artifiziellen HS-Fe(III)-Spezies in der XAD 8-Probe zeigten eine deutlich höhere Cu(II)-Labilität (76 %). Auch bei Al gibt es signifikante Unterschiede. So ist die artifizielle Al(III)-Beladung voll austauschfähig, aber nur 33 % des Al in HO17-UF sowie fast 70 % im Fall des „natürlichen“ Al in HO17. Dies kann man möglicherweise dadurch erklären, daß ein Teil des Al in HO17-UF bei der Aufkonzentrierung „frei“ oder an Moleküle mit einer Molmasse kleiner als 1 kDa gebunden wurde und deshalb aus der Kalkulation der Austauschfähigkeit herausfiel.

**Tab. 31:** Austauschfähigkeit gegenüber Cu(II) von Elementen in natürlichen, vorangereicherten und artifiziellen HS-Metallspezies [%]

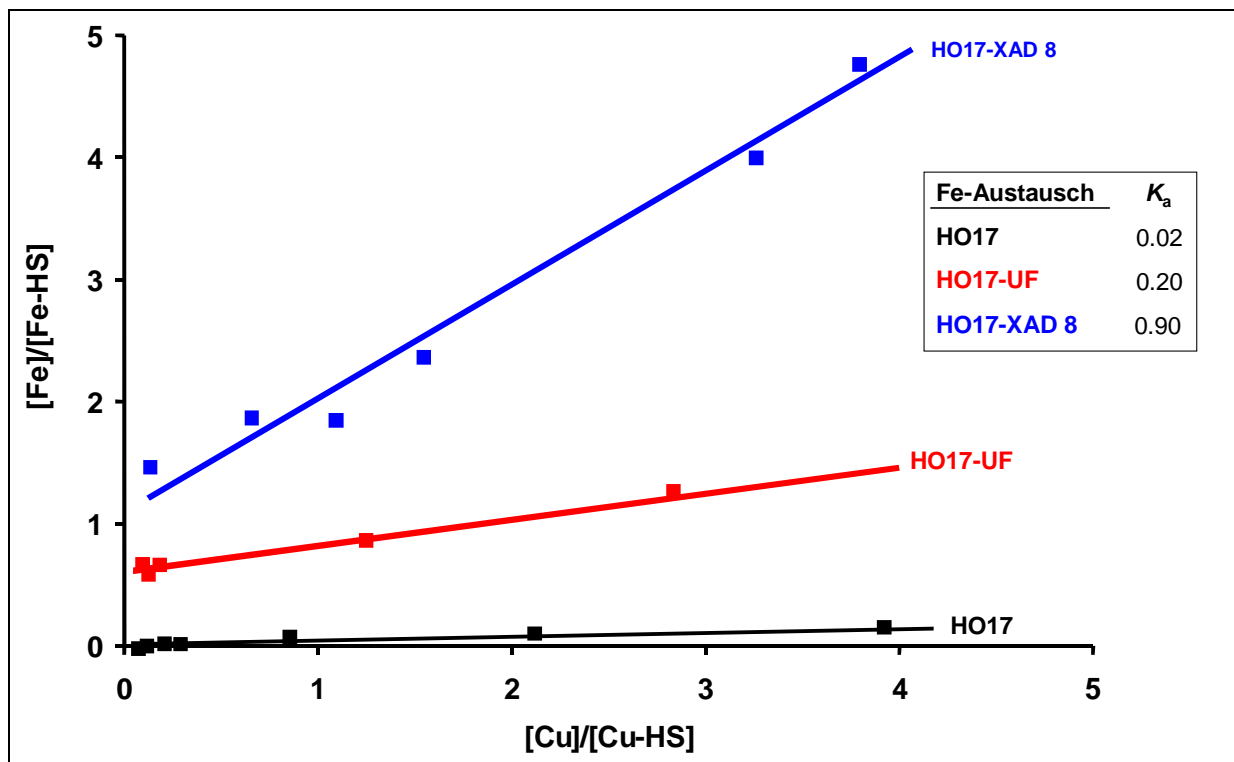
Element	HO17**	HO17-UF	HO17-XAD 8
Al	69 ± 5	33 ± 2	100 ± 5
Fe	23 ± 3	22 ± 5	76 ± 10
Mn	100 ± 2	100 ± 1	100 ± 2
Zn	99 ± 2	*	100 ± 4
Mg	100 ± 1	100 ± 1	100 ± 3
Sr	100 ± 1	100 ± 1	32 ± 5
Ca	100 ± 2	100 ± 10	100 ± 12

\*nicht auswertbar, \*\*Vor-Ort-Austausch

Wie bereits in 4.7.1. dargestellt, lassen sich mittels Cu(II)-Beladung von HS auch die Austauschkonstanten  $K_a$  zwischen den konkurrierenden Cu(II)-Ionen und den vorliegenden HS-Metallspezies ermitteln. Diese wurden hier ebenfalls zum Vergleich der Metallspezies in HO17, HO17-UF und HO17-XAD 8 herangezogen. Diesbezügliche Ergebnisse sind in Abbildung 49 für Fe und in Tabelle 32 auch für die anderen Metalle dargestellt.

Wie aus Abbildung 49 ersichtlich ist, unterscheidet sich die Austauschkonstante  $K_a$  für Fe(III) in HO17-XAD 8 signifikant von der für Fe(III) in HO17 und HO17-UF. Demnach erweisen sich die artifiziiellen Fe(III)-Spezies in HO17-XAD 8 als wesentlich schwächere Komplexe als die natürlichen Fe-Spezies in HO17.

Ähnlich wie beim EDTA-Austausch zeigen also natürliche, vorangereicherte und artifiziielle Al- bzw. Fe-Spezies in den HO17-Proben auch beim Austausch mit Cu(II) besonders ausgeprägte Unterschiede.



**Abb. 49:** Cu(II)-Austausch mit HS-Fe-Spezies; Gleichgewichte und Austauschkonstanten  $K_a$  natürlicher, vorangereicherter und artifiziieller Spezies

Ähnliche  $K_a$ -Unterschiede zwischen artifiziiellen und natürlichen Metallspezies sind auch im Fall von Al sowie bei den Erdalkalielelementen zu beobachten (Tab. 32). Während die Austauschkonstanten  $K_a$  der natürlichen und mittels UF vorangereicherten HS-Metallspezies, z.B. für Al, Mg und Ca, in HO17 und HO17-UF mehr oder weniger vergleichbar sind, liegen sie für artifiziielle Spezies teils höher, z.B. bei Fe, teils aber auch niedriger, z.B. bei Ca. Hiermit belegen auch die Austauschkonstanten  $K_a$ , daß das Verhalten der natürlichen HS-

Metallspezies in Gewässern nicht durch artifizielle Metallbelastungen in isolierten HS-Lösungen simuliert werden kann.

**Tab. 32:** Austauschkonstanten  $K_a$  von isolierten bzw. artifiziellen HS-Metallspezies

Element	HO17**	HO17-UF	HO17-XAD 8
Al	0.08	0.01	0.62
Fe	0.02	0.20	0.90
Mn	23.8	*	*
Zn	*	*	7.10
Mg	33.3	36.9	*
Sr	*	2.06	0.20
Ca	66.6	77.5	8.03

\*nicht auswertbar, \*\*Vor-Ort-Austausch

## 4.8. Transformationsvorgänge in Huminstoffen

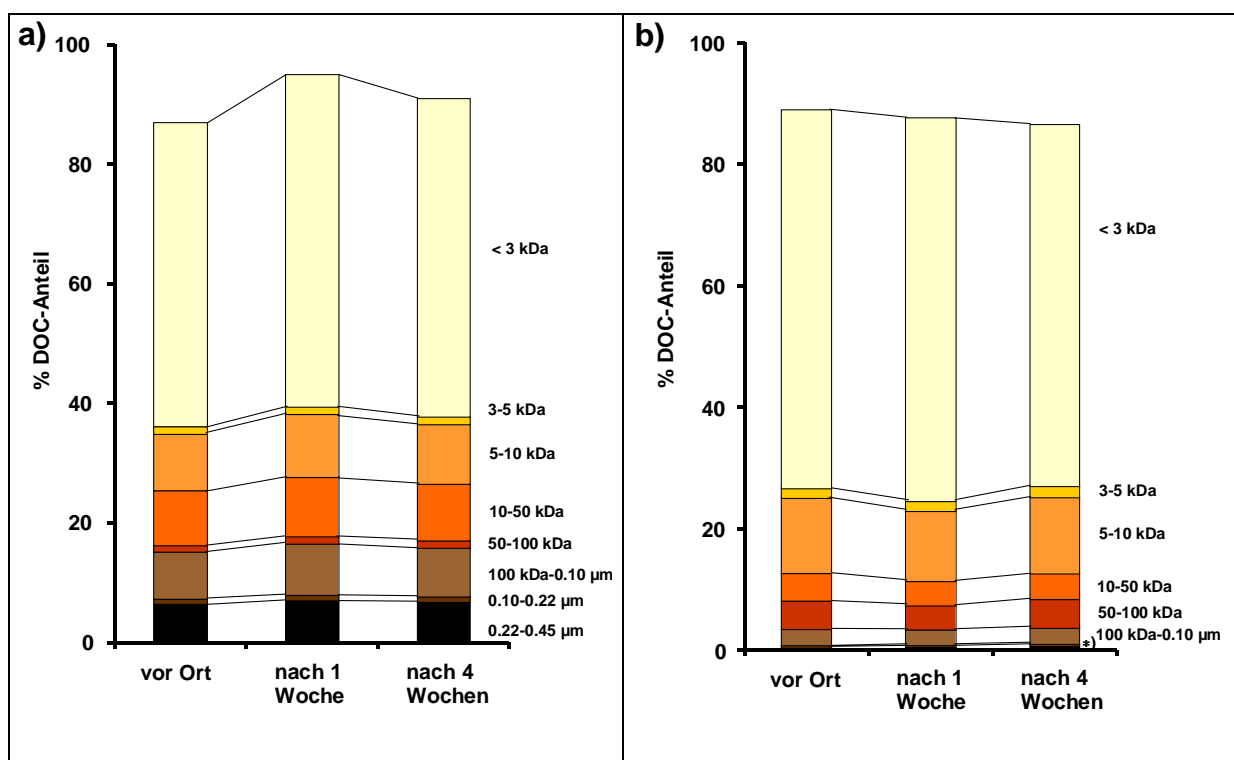
HS in aquatischen Systemen werden häufig als refraktäre organische Substanzen betrachtet, deren Primärstrukturen relativ stabil gegen chemische Veränderungen sind. Strukturelle Untersuchungen an isolierten Referenz-HS, die im Rahmen von DFG-ROSIG durchgeführt wurden, bestätigen diese Auffassung weitgehend. HS in Gewässern sind darüber hinaus jedoch Bestandteil eines dynamischen Hydrokolloids, das hinsichtlich seiner Größenverteilung und Teilchenform schnellen Veränderungen unterliegen kann. Ähnliches ist auch bei den natürlichen HS-Metallspezies zu vermuten. Bisher sind jedoch nur wenige Informationen hierzu bekannt. Deshalb wurde auch die Stabilität HS-haltiger Hydrokolloide vor Ort, nach einer, zwei und vier Wochen in Bezug auf ihre Molekülgrößenverteilung, Metall-Labilität („Verfügbarkeit“) sowie molekulare Struktur hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Proben, vor Ort 0.45 µm-filtriert, fraktioniert und im Labor nach Lagerung bei 15 °C im Dunkeln erneut untersucht.

### 4.8.1. Änderungen der Molekülgrößenverteilung

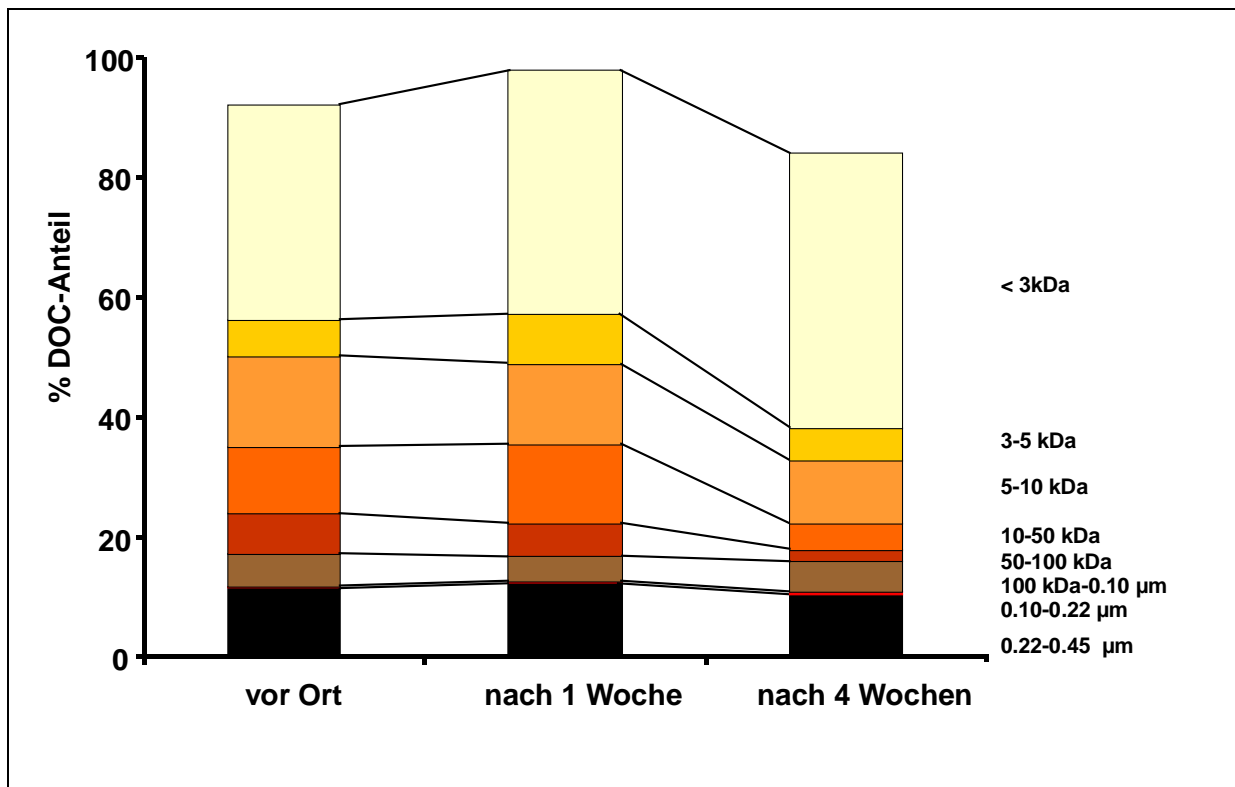
Wie schon unter Punkt 3.4. erörtert, bilden HS in wässriger Lösung komplexe Strukturen aus, die in der Literatur als Micellen, Membranen, Polyelektrolyte, Partikel oder Aggregate betrachtet werden. Diese Lösungsstrukturen können durch Aggregation und Dissoziation fortlaufend Veränderungen unterworfen sein [15]. Aus diesem Grund wurde die Molekülgrößenverteilung des DOC in verschiedenen Proben mittels MST-UF und P-UF in gewissen

Zeitabständen unter standardisierten Bedingungen stets von neuem charakterisiert. Wie aus Abbildung 50 a und b ersichtlich ist, sind die DOC-Größenverteilungen in den gelagerten Referenzproben HO16 bzw. HO17 im subpartikulären wie auch im makromolekularen Bereich überraschend stabil, sogar nach vier Wochen Lagerungszeit. Dies gilt jedoch nicht für Proben, die einschließlich ihrer Schwebstoffe von  $> 0.45 \mu\text{m}$  gelagert wurden.

Im Gegensatz zu den HO-Referenzproben ist die gelagerte VM7-Wasserprobe deutlich weniger stabil, wie der Abbildung 51 zu entnehmen ist. Der subpartikuläre Bereich in VM7 ist bis zu vier Wochen stabil, nicht jedoch die Fraktionen von 10-50 und 50-100 kDa, deren DOC nach einer Woche Lagerung stark abnimmt.

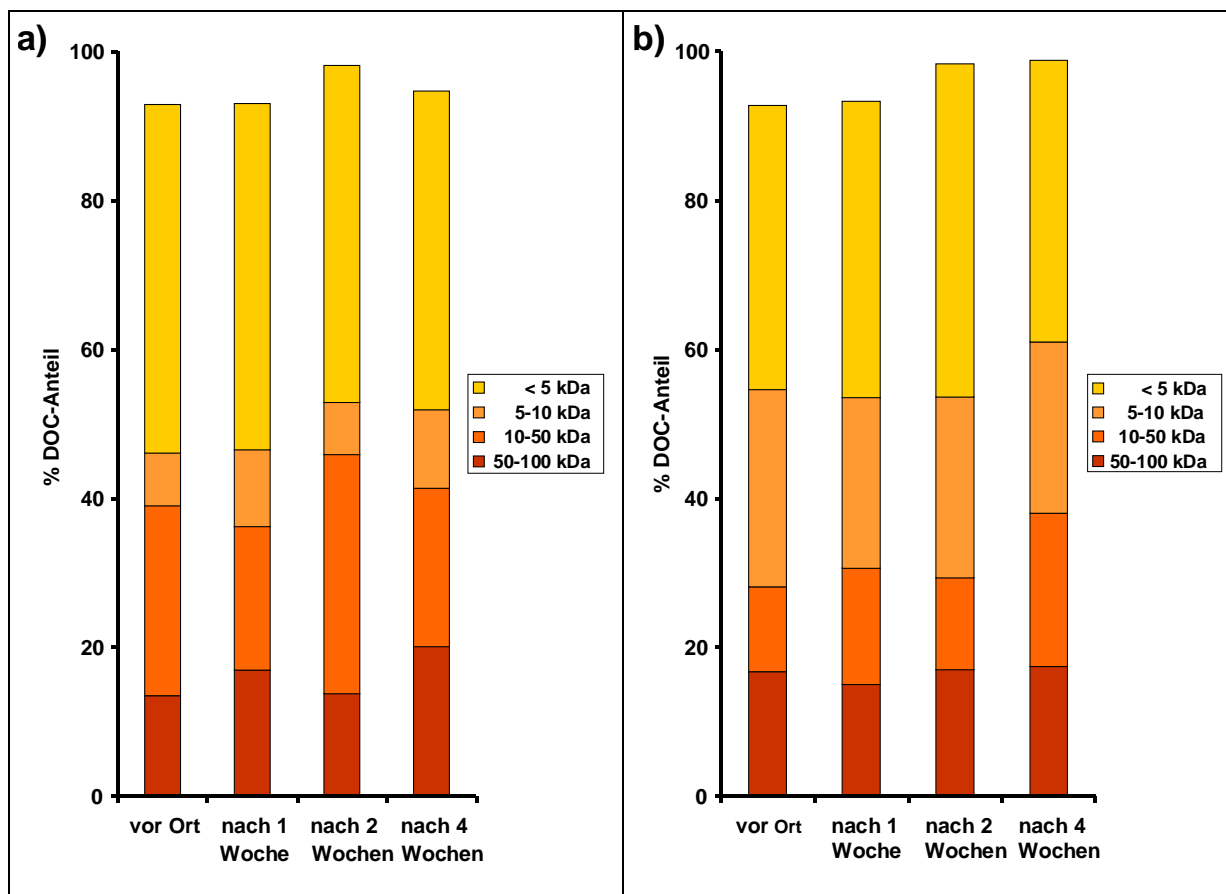


**Abb. 50:** DOC-Größenverteilung und deren Stabilität in Wasserproben (ROSIG), ermittelt durch MST-UF (a: HO16, b: HO17,\* subpartikulärer Bereich)



**Abb. 51:** DOC-Größenverteilung und deren Stabilität in **VM7**, ermittelt durch MST-UF

Änderungen der DOC-Größenverteilung in den Proben AW3 und VM8 sind in Abbildung 52 a und b zusammengefasst. In diesen Fällen wurde die P-UF als Fraktionierungsmethode eingesetzt. Auch in VM8 ist die Größenverteilung innerhalb von vier Wochen relativ stabil, abgesehen von der Fraktion 10-50 kDa. Eine ähnliche Stabilität der Molekülgrößenverteilung ist in der Probe AW3 festzustellen.



**Abb. 52:** DOC-Größenverteilung und deren Stabilität (a: **AW3**, b: **VM8**), ermittelt durch P-UF

(DOC-Anteile in Fraktionen durch Differenzbildung ermittelt)

Veränderungen des Gesamt-DOC bei Lagerung der Wasserproben sind in Tabelle 33 zusammengefasst. Demnach nimmt der DOC der Originalproben nur in geringem Maße durch Alterung ab, abgesehen von AW3. Der DOC in AW4 und VM7 erwies sich ähnlich stabil wie in AW3 bzw. VM8.

**Tab. 33:** DOC-Veränderungen bei Probenlagerung (DOC der Vor-Ort-Probe gleich 100 % gesetzt)

Probe	vor Ort	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 4 Wochen
AW3,%	100	96.1	95.1	91.0
VM8,%	100	99.2	98.9	96.6
HO16,%	100	99.9	99.9	99.8

#### 4.8.2. Änderungen der Metallgehalte, -komplexierungskapazitäten und -verfügbarkeiten

Mögliche Veränderungen der verschiedenen Metall-Gesamtgehalte bei Lagerung der Wasserproben wurden mittels ICP-OES verfolgt. Sie sind in Tabelle 34 aufgeführt. Demnach nimmt der Metall-Gesamtgehalt der Originalprobe HO16 nur bei Fe (ca. 15 %) und Zn (ca. 18 %) durch Alterung ab, vermutlich durch Sorptionsvorgänge an Gefäßwandungen. Die anderen Metalle weisen auch nach vierwöchiger Probenlagerung gleichbleibende Gesamtgehalte auf. Eine ähnliche Stabilität ergab sich auch bei den anderen Wasserproben, wobei sich jedoch Al und Fe nicht immer gleich verhielten.

**Tab. 34:** Gesamt-Metallgehalte [ $\mu\text{g/L}$ ]: Veränderungen bei Probenlagerung, Probe: HO16

Metall	vor-Ort	nach 1 Woche	nach 4 Wochen
Al	103	103	102
Fe	280	265	239
Mn	9	10	10
Zn	111	100	91
Mg	166	167	173
Sr	3	3	3
Ca	479	475	547*

\* möglicher Ausreißer, Mittelwerte aus drei Messungen (n=3)

Neben den Metall-Gesamtgehalten wurde auch die konditionelle  $KK_{\text{Cu(II)}}$  der Wasserproben auf etwaige Veränderungen während deren Lagerung untersucht. Hierzu diente das bereits beschriebene Cu(II)-Beladungsverfahren (s. Punkt 4.7.1.).

Diesbezügliche Ergebnisse sind in Abbildung 53 am Beispiel von HO16 dargestellt. Wie ersichtlich, nimmt die  $KK_{\text{Cu(II)}}$  bereits innerhalb einer Woche ab, stabilisiert sich aber nach vier Wochen. Dieses Phänomen kann man möglicherweise dadurch erklären, daß konformationelle Umlagerungen in den vorliegenden HS-Aggregaten stattfinden, die den Zugang zu den Liganden erschweren. Ein derartiger Effekt könnte auch die Austauschkinetik beeinflussen. Vor jeder  $KK_{\text{Cu(II)}}$ -Bestimmung wurden der DOC-Wert und die verschiedenen Metall-Gesamtgehalte bestimmt, um eine systematische Verfälschung auszuschließen. Der  $KK_{\text{Cu(II)}}$ -Wert von HO16 fällt insgesamt um ca. ein Drittel zurück. Vergleichbare Trends der  $KK_{\text{Cu(II)}}$  wurden auch in den anderen Wasserproben, z.B. bei VM8, festgestellt.



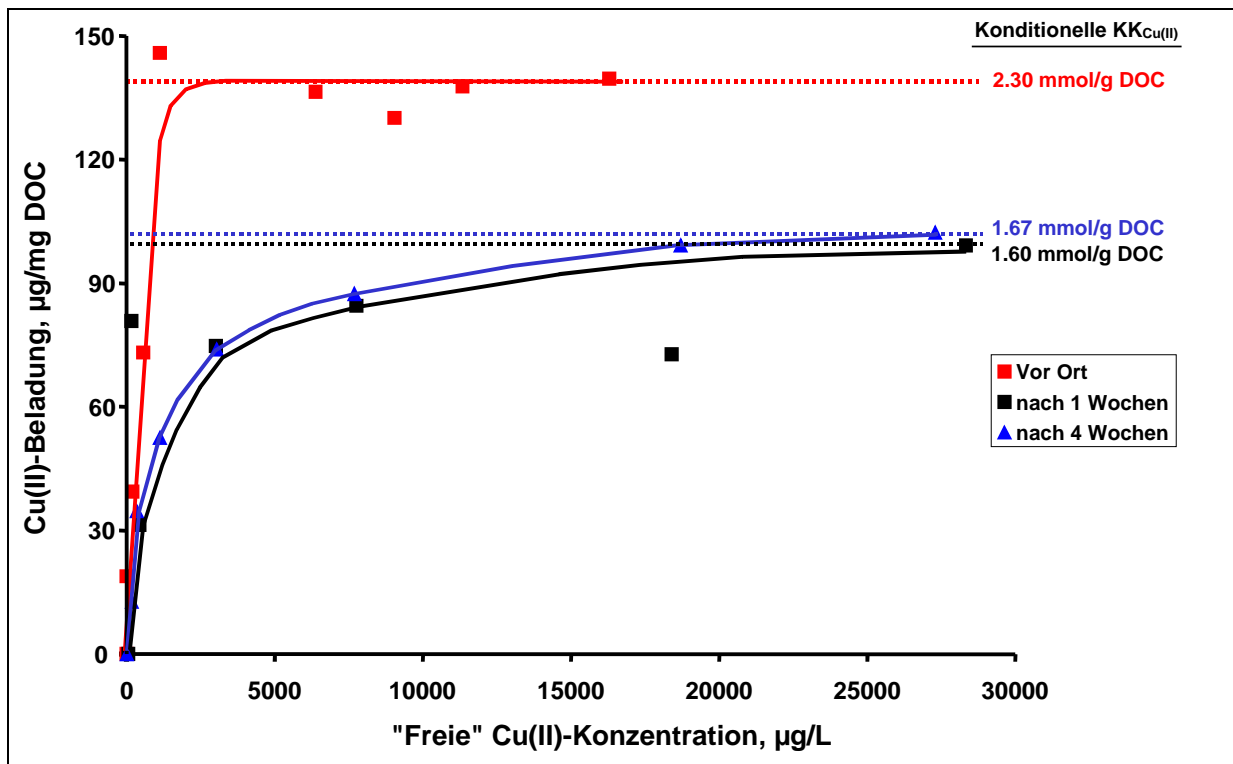


Abb. 53: Konditionelle  $KK_{Cu(II)}$  von HO16: Veränderungen bei Probenlagerung

Die Verfügbarkeit („Labilität“) von Metallen in natürlichen HS-Metallspezies, die mittels Liganden- oder Metallaustausch vor Ort erfaßt wurde, ist bereits unter Punkt 4.5. bzw. 4.7. diskutiert worden. Bisher gibt es nur wenige Informationen über etwaige zeitliche Veränderungen dieser Eigenschaft, abgesehen von wenigen Ionenaustauscharbeiten. Diese Frage ist jedoch von erheblicher Relevanz, wenn es um systematische Veränderungen des Verhaltens hydrokolloidaler Metallspezies nach ihrer Probenahme geht. Eine Vor-Ort-Analytik derartiger Spezies ist immer dann unumgänglich, wenn ihre Lagerung zu unerwünschten Artefakten führt. Zur Klärung dieser Frage wurde der EDTA- bzw. Cu(II)-Austausch an natürlichen Metallspezies in den verschiedenen Proben nach bestimmten Lagerungszeiten wiederholt.

Als typisches Beispiel zeigt Abbildung 54 die EDTA-Labilität der Fe-Spezies in VM7 nach verschiedenen Lagerungszeiten. Wie ersichtlich, beträgt die Fe-Verfügbarkeit vor Ort 98 %, nimmt aber innerhalb einer Woche auf 88 % ab. Nach vier Wochen beträgt sie nur noch 76 %. Bei logarithmischer Auftragung dieser Austauschkurven (Abb. 55), in Anlehnung an Gleichung 43 (s. Seite 68), ergeben sich zwei vergleichbare Geschwindigkeitsschritte erster Ordnung für den EDTA-Austausch. Der erste Austauschschritt weist eine Halbwertszeit  $t_{1/2}$  von etwa 0.9 h, der zweite eine solche von etwa 430 h auf. Vor Ort werden über 90 % der verfügbaren Fe-Spezies während des ersten Schrittes ausgetauscht, nach zweiwöchiger Lagerung nur noch 80 %.

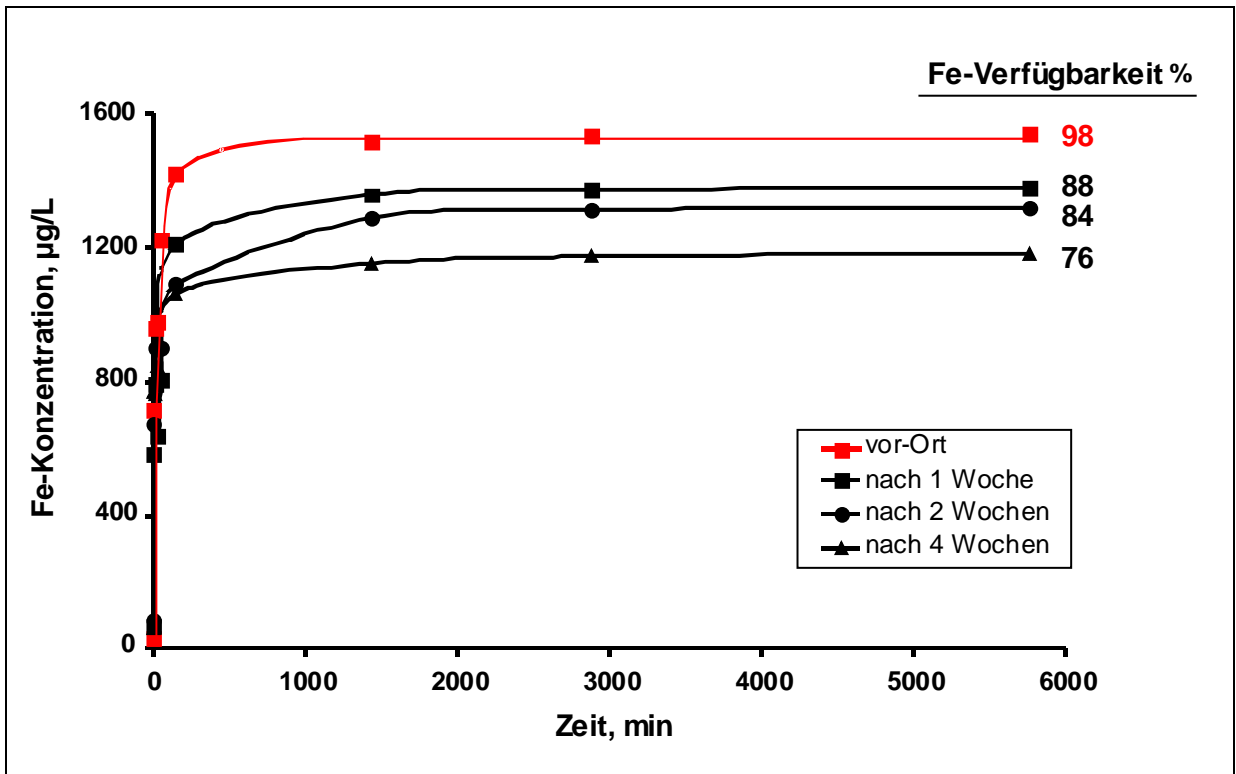


Abb. 54: EDTA-Austausch an natürlichen Fe-Spezies: Einfluß der Probenlagerung, Probe **VM7**

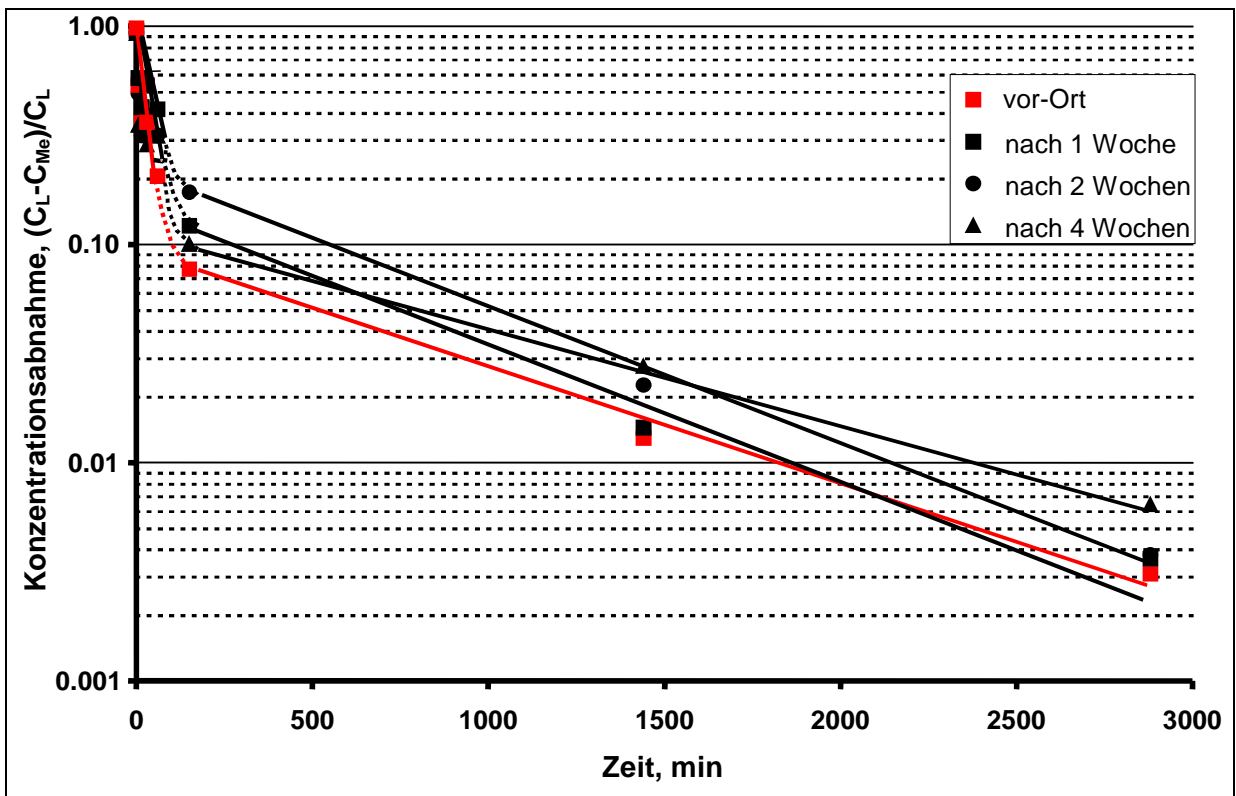


Abb. 55: EDTA-Austausch an natürlichen Fe-Spezies: Zeitlicher Verlauf in Abhängigkeit von der Probenlagerung; Probe: **VM7**

In einer weiteren Versuchsreihe wurden eventuelle Änderungen im Austauschverhalten von natürlichen Metallspezies aus verschiedenen HS-reichen Wasserproben gegenüber EDTA bzw. Cu(II) bei Lagerung (15°C, im Dunkeln) verfolgt. Die nachfolgende Tabelle 35 beschreibt diesbezügliche Veränderungen in der Probe VM8.

**Tab. 35:** EDTA- bzw Cu(II)-Austausch in **VM8**: Einfluß der Probenlagerung

Metallion	Labil, %	vor Ort	nach 1 Woche	nach 4 Wochen
Al	EDTA-labil	75 ± 2	70 ± 3	70 ± 5
	Cu(II)-labil	48 ± 5	54 ± 4	57 ± 3
Fe	EDTA-labil	95 ± 4	80 ± 2	80 ± 5
	Cu(II)-labil	20 ± 2	17 ± 1	11 ± 2
Mn	EDTA-labil	95 ± 1	82 ± 4	78 ± 2
	Cu(II)-labil	94 ± 4	99 ± 5	97 ± 2
Zn	EDTA-labil	54 ± 1	*	67 ± 3
	Cu(II)-labil	*	*	88 ± 4
Mg	EDTA-labil	61 ± 2	49 ± 4	42 ± 4
	Cu(II)-labil	100 ± 3	100 ± 4	100 ± 1
Sr	EDTA-labil	50 ± 1	36 ± 3	*
	Cu(II)-labil	100 ± 4	96 ± 4	94 ± 2
Ca	EDTA-labil	54 ± 4	49 ± 5	46 ± 4
	Cu(II)-labil	100 ± 6	100 ± 3	100 ± 6

KK/EDTA ≈ 1/1, KK/Cu ≈ 1/1, \* nicht auswertbar

Wie ersichtlich, fällt die EDTA-labile Fraktion von Al bzw. Fe bereits nach einer Woche deutlich ab, ähnlich wie bei VM7. Das gleiche gilt für die Mn- und die Erdalkalispezies. Der Cu(II)-labile Anteil von Al und Fe ist deutlich kleiner als der EDTA-labile. Er nimmt beim Al während der Probenlagerung zu, beim Fe deutlich ab. Die Erdalkaliionen lassen sich nahezu 100-prozentig mit Cu(II) austauschen, auch noch nach vier Wochen. Dies läßt sich dadurch erklären, daß die Erdalkaliionen überwiegend für den Ladungsausgleich an den gelösten HS (ionische Bindung) dienen und nicht komplexiert vorliegen.

Die Tabellen 36 und 37 beschreiben ähnliche Veränderungen im Austauschverhalten für die Proben HO16 bzw. AW3 in Abhängigkeit von ihrer Lagerungszeit.

**Tab. 36:** EDTA- bzw Cu(II)-Austausch in HO16: Einfluß der Probenlagerung

Metallion	Labil, %	vor Ort	nach 1 Woche	nach 4 Wochen
Al	EDTA-labil	78 ± 2	69 ± 2	96 ± 1
	Cu(II)-labil	16 ± 2	31 ± 3	38 ± 2
Fe	EDTA-labil	76 ± 1	45 ± 3	82 ± 2
	Cu(II)-labil	5 ± 2	5 ± 1	11 ± 2
Mn	EDTA-labil	67 ± 1	57 ± 4	93 ± 3
	Cu(II)-labil	100 ± 10	99 ± 5	95 ± 12
Zn	EDTA-labil	86 ± 2	71 ± 2	*
	Cu(II)-labil	90 ± 11	*	91 ± 2
Mg	EDTA-labil	49 ± 2	20 ± 3	52 ± 3
	Cu(II)-labil	100 ± 8	98 ± 6	100 ± 5
Sr	EDTA-labil	67 ± 1	30 ± 1	100 ± 4
	Cu(II)-labil	99 ± 8	100 ± 1	94 ± 3
Ca	EDTA-labil	36 ± 4	38 ± 2	*
	Cu(II)-labil	100 ± 21	100 ± 5	100 ± 5

KK/EDTA ≈1/1, KK/Cu ≈1/1,\* nicht auswertbar

Im Gegensatz zu VM8 nimmt im Fall von HO16 die EDTA-Verfügbarkeit von Al und Fe bei der Lagerung deutlich zu, in gewissem Maße auch ihre Cu(II)-Labilität. Auch die EDTA-Verfügbarkeit des Mn steigert sich deutlich mit der Zeit auf über 90 %. Praktisch keine Veränderungen sind hinsichtlich der hohen Cu(II)-Labilität der Mn- bzw. Erdalkalispezies festzustellen, nicht einmal nach vier Wochen.

Bei Lagerung der Wasserprobe AW3 sind ähnliche Trends festzustellen. Die EDTA-Verfügbarkeit von Al und Fe erreicht nach vier Wochen fast 100 %. Gegenläufig ist der Trend der Cu(II)-Labilität. Die hohe Cu(II)-Labilität der natürlichen Zn- bzw. Erdalkali-Beladung hingegen ändert sich mit der Zeit kaum.

Das Austauschverhalten von natürlichen Metallspezies in HS-reichen Wasserproben gegenüber EDTA und Cu(II) kann sich also schon innerhalb weniger Tage deutlich in beide Richtungen verändern. Während es in hochmolekularen und DOC-reichen Wasserproben, z.B. in VM8, eher zu einer Minderung der Metallverfügbarkeit kommt, steigt diese in DOC-armen bzw. leicht sauren Proben, z.B. HO16 und AW3, deutlich an. In diesem Fall kann die saure Hydrolyse der vorliegenden HS-Metallspezies eine gewisse Rolle spielen. Jedenfalls zeigen diese Ergebnisse die Notwendigkeit einer möglichst schnellen Charakterisierung von hydrokolloidalen Metallspezies in Gewässern auf.

**Tab. 37:** EDTA- bzw Cu(II)-Austausch in AW3: Einfluß der Probenlagerung, **AW3**

Metallion	Labil, %	vor Ort	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 4 Wochen
Al	EDTA-labil	70 ± 3	82 ± 2	83 ± 4	91 ± 5
	Cu(II)-labil	50 ± 7	58 ± 4	44 ± 4	45 ± 2
Fe	EDTA-labil	61 ± 4	81 ± 2	86 ± 4	96 ± 2
	Cu(II)-labil	27 ± 10	17 ± 2	6 ± 6	21 ± 6
Mn	EDTA-labil	62 ± 4	67 ± 4	72 ± 3	80 ± 4
	Cu(II)-labil	95 ± 4	91 ± 5	83 ± 7	63 ± 9
Zn	EDTA-labil	72 ± 1	*	*	86 ± 5
	Cu(II)-labil	99 ± 2	*	87 ± 6	86 ± 3
Mg	EDTA-labil	51 ± 2	69 ± 2	68 ± 2	*
	Cu(II)-labil	92 ± 2	92 ± 1	85 ± 2	92 ± 3
Sr	EDTA-labil	62 ± 1	65 ± 2	69 ± 4	83 ± 4
	Cu(II)-labil	91 ± 2	90 ± 2	83 ± 1	100 ± 6
Ca	EDTA-labil	59 ± 3	71 ± 1	81 ± 4	86 ± 4
	Cu(II)-labil	100 ± 6	1100 ± 3	100 ± 12	100 ± 6

KK/EDTA ≈ 1/1, KK/Cu ≈ 1/1, \* nicht auswertbar

### **Änderung der Austauschkonstanten**

Wie bereits unter 4.7.1. erörtert, können die Austauschkonstanten  $K_a$  zwischen natürlichen Metallspezies und zugesetztem Cu(II) zur anschaulichen Beschreibung der relativen Stabilität der vorliegenden Komplexe genutzt werden. Die Frage ist offen, ob auch diese gewissen Änderungen durch „Alterung“ der in den Wasserproben vorliegenden Metallspezies unterliegen. Zur Klärung dieser Frage wurden Austauschkonstanten  $K_a$  in gealterten Referenzproben ermittelt und mit denen verglichen, die bereits durch vor Ort-Austausch erhalten worden waren.

Als typisches Beispiel faßt die Tabelle 38 Cu(II)-Austauschkonstanten  $K_a$  zusammen, die für die Probe VM8 vor Ort, nach einer und nach vier Wochen erhalten wurden. Demnach verändern sich die niedrigen  $K_a$ -Werte für den Al- bzw. Fe-Austausch innerhalb von vier Wochen nur mäßig, zum Teil nach oben (Al), zum Teil nach unten (Fe). Extrem hoch ist der Abfall der Konstanten für Mn, Mg, Sr und Ca, die sich bereits innerhalb einer Woche auf 1/10 bis 1/50 ihrer Vor-Ort-Werte vermindern. Es ist zu vermuten, daß diese HS-Metallkomplexe bei Probenahme noch nicht im thermodynamischen Gleichgewicht mit den verfügbaren HS-Liganden waren. Möglicherweise besetzten die besagten Metallionen im Verlauf der

Probenlagerung vorzugsweise solche HS-Liganden, um die die eingesetzten Cu(II)-Ionen nur wenig konkurrierten.

**Tab. 38:** Austauschkonstanten  $K_a$ : Einfluß der Probenlagerung, Probe: **VM8**

Metallion	vor Ort	nach 1 Woche	nach 4 Wochen
Al	0.18	0.16	0.32
Fe	0.08	0.02	0.03
Mn	4.13	2.04	1.48
Zn	*	*	1.45
Mg	51.2	1.66	1.69
Sr	9.86	2.34	0.78
Ca	91.0	1.72	1.33

KK/Cu  $\approx$  1/1, \* nicht auswertbar

Ähnliche Veränderungen der Austauschkonstanten  $K_a$  natürlicher Metallspezies beim Austausch mit Cu(II) in gealterten Wasserproben sind im Fall von HO16 zu beobachten (Tab. 39).

**Tab. 39:** Austauschkonstanten  $K_a$ : Einfluß der Probenlagerung, Probe: **HO16**

Metallion	vor Ort	nach 1 Woche	nach 4 Wochen
Al	0.01	0.01	0.02
Fe	0.01	0.01	0.01
Mn	66.7	*	0.21
Zn	2.10	*	0.10
Mg	16.7	5.62	17.6
Sr	*	1.34	0.29
Ca	21.2	2.73	*

KK/Cu  $\approx$  1/1, \* nicht auswertbar

Insbesondere die Mn-Spezies in HO16 zeigen eine starke Minderung ihres  $K_a$ -Wertes, möglicherweise aufgrund eines Wechsels der Oxidationsstufe (z.B. Mn(II)/Mn(IV)).

In Tabelle 40 sind die Austauschkonstanten  $K_a$  für natürliche Metallspezies und Cu(II), die nach verschiedenen Zeiten der Probenalterung in AW3 ermittelt wurden, zusammengefaßt.

**Tab. 40:** Austauschkonstanten  $K_a$ : Einfluß der Probenlagerung, Probe: **AW3**

Metallion	vor Ort	nach 1 Woche	nach 2 Wochen	nach 4 Wochen
Al	0.06	0.12	0.13	0.24
Fe	0.03	0.01	0.02	0.16
Mn	1.24	0.32	0.72	2.87
Zn	0.07	*	*	0.27
Mg	1.48	0.11	1.30	1.75
Sr	1.80	0.12	0.60	0.43
Ca	5.29	1.12	4.30	1.51

KK/Cu  $\approx$  1/1, \* nicht auswertbar

Für die  $K_a$ -Werte in AW3 sind keine eindeutigen Trends bei der Probenlagerung zu beobachten, abgesehen vom ansteigenden  $K_a$ -Wert der Al-Spezies. Bei den anderen Metallspezies (z.B. denen von Fe, Mn, Mg, Sr, Ca) laufen die gefundenen  $K_a$ -Werte nach ein bis zwei Wochen eher durch ein Minimum, ehe sie nach vier Wochen fast wieder auf ihr Vor-Ort-Niveau zurückkehren. Insgesamt unterliegen die Austauschkonstanten starken Veränderungen. Auch die Verhältnisse zwischen den  $K_a$ -Werten verschiedener Metallspezies, die im Prinzip ihre relative Stabilität zueinander beschreiben, verschieben sich teilweise erheblich im Verlauf der Probenlagerung. Der Cu(II)-Austausch an natürlichen HS-Metallspezies zeigt damit auf, daß diese schon nach relativ kurzer Probenlagerung signifikanten Transformationen unterliegen. Deren Natur bleibt allerdings noch offen.

### 4.8.3. Strukturelle Veränderungen

Wie schon erwähnt, werden HS auch als refraktäre organische Substanzen (ROS) definiert, deren Strukturen über längere Zeit stabil bleiben. Es ist deshalb zu erwarten, daß diese Stabilität auch im Fall einer längeren Probenlagerung erhalten bleibt, Lichtausschluß vorausgesetzt.

Trotz dieser Erwartung wurden die HS in den gelagerten Wasserproben auch mit Hilfe molekülspektroskopischer Methoden, speziell mit  $^1\text{H-NMR}$  und 2D-Fluoreszenz, auf eventuelle strukturelle Änderungen hin untersucht. Letztere sind z.B. dann möglich, wenn sich nach der Probenahme unerwünschte mikrobiologische Prozesse fortsetzen.

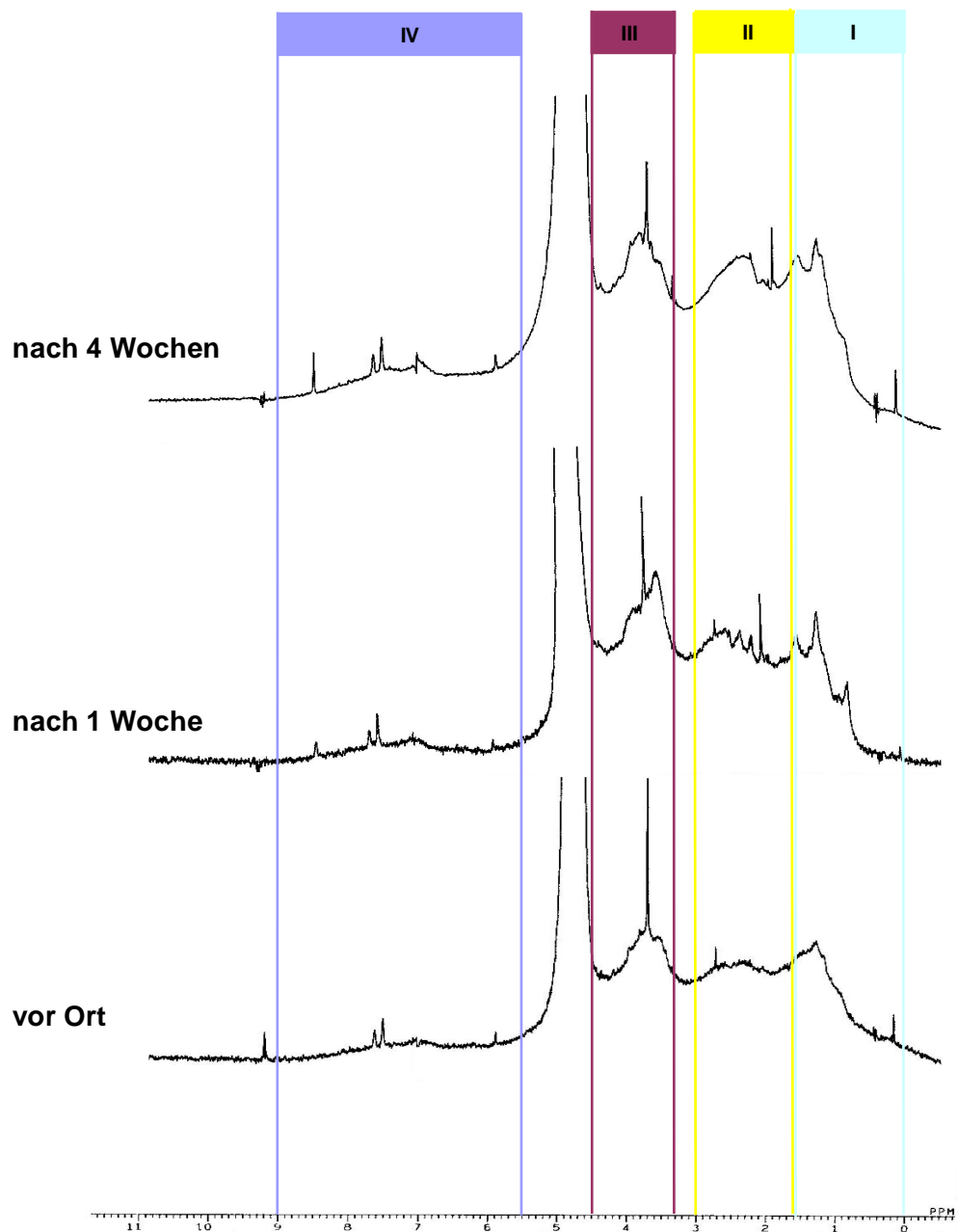
#### ***$^1\text{H-NMR-Spektroskopie}$***

$^1\text{H-NMR}$ -Untersuchungen wurden vorzugsweise an HS-reichen Größenfraktionen DOC-reicher Wasserproben, z.B. VM8, durchgeführt. Als typisches Beispiel gibt die Abbildung 56 die  $^1\text{H-NMR}$ -Übersichtsspektren des Bereiches  $< 100$  kDa von VM8, der vor Ort, nach einer Woche und nach vier Wochen mittels P-UF gewonnen wurde, wieder.

Insgesamt zeigen die  $^1\text{H-NMR}$ -Spektren der untersuchten HS-Fraktion in VM8 keine wesentlichen Änderungen im Verlauf der Lagerung, verschiedene kleine Singulettsignale ausgenommen.

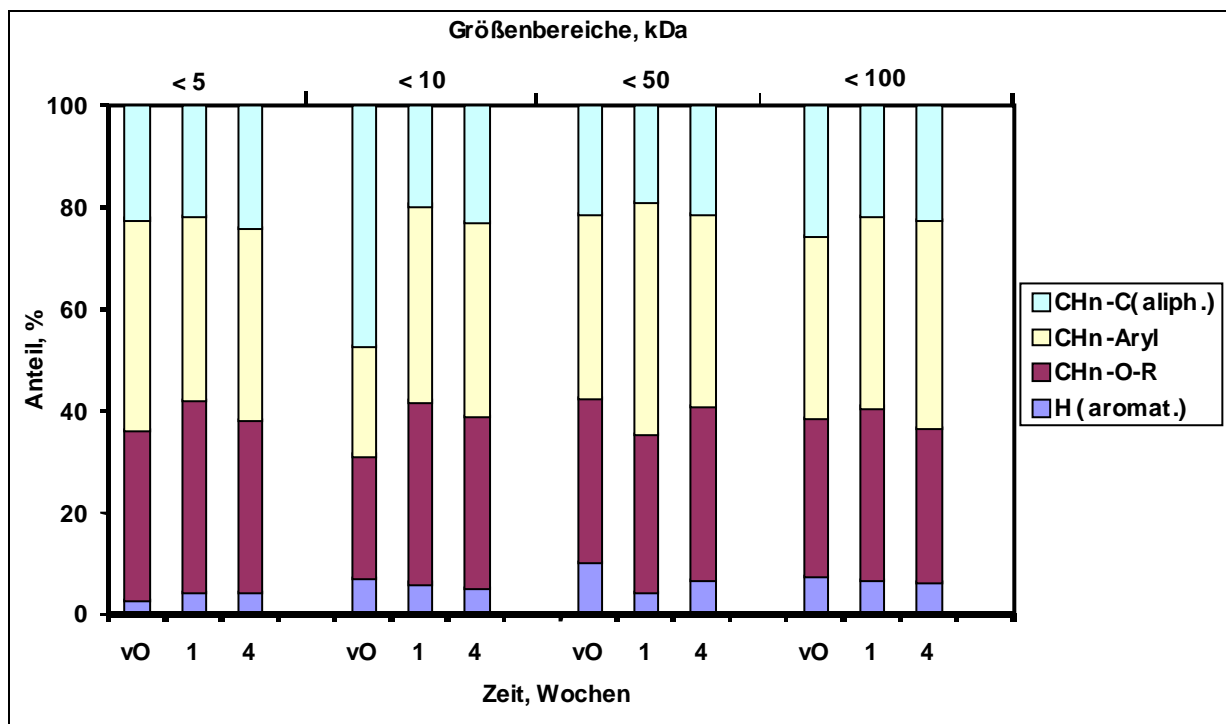
Das Singulett bei 3.6 ppm gehört zur Malonsäure und das bei 2.0 ppm zu einer Acetyl-Funktion, wie z.B. in Aceton oder Essigsäure, oder zu  $\text{CH}_3\text{CN}$ . Das Singulett bei 8.3 ppm, freie Ameisensäure, nimmt im Größenbereich  $< 100$  kDa und auch bei allen anderen Bereichen von vor Ort über eine Woche zu vier Wochen hin stetig zu. Zu erklären ist dies eventuell durch Decarboxylierungsprozesse [126] und durch mikrobiologische Prozesse [127] in den HS-Fractionen.





**Abb. 56:** <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren des Größenbereiches < 100 kDa von VM8 in Abhängigkeit von der Lagerzeit

In Abbildung 57 sind die <sup>1</sup>H-NMR-Übersichtsspektren der vier Größenbereiche von VM8 summarisch zusammengefaßt. Sie zeigen einander recht ähnliche Spektren, Singulettssignale ausgenommen. Alle Proben haben nur einen geringen Gehalt an Aromatenprotonen. Die geringe Zunahme des „Kohlenhydratbereichs“ (Bereich II) von vor Ort bis zu einer Woche hin hat sich nicht fortgesetzt. Insgesamt sind keine eindeutigen Trends zu erkennen. Die Schwankungen der Signale um 3 bis 5 % liegen innerhalb des Gesamtfehlers von P-UF und <sup>1</sup>H-NMR.



**Abb. 57:** Signalgruppen (I-IV) aus den  $^1\text{H-NMR}$ -Übersichtsspektren der P-UF-Größenbereiche von **VM8** in Abhängigkeit von ihrer Lagerung, vO: vor Ort

Eine ähnliche Stabilität der HS-Strukturen in gelagerten Wasserproben konnte mittels  $^1\text{H-NMR}$  auch im Fall von AW3 belegt werden.

### **2D-Fluoreszenz-Spektroskopie**

Strukturelle Änderungen von HS in gealterten Wasserproben wurden am Beispiel von VM8 auch mittels 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht.

Diesbezügliche Ergebnisse sind in Tabelle 41 zusammengefaßt. Demnach verändern sich die beiden bei 456 und 464 nm detektierten Fluorophore der HS weder in ihrer Wellenlänge noch in ihrer Intensität.

Insgesamt zeigen die  $^1\text{H-NMR}$ - und 2D-Fluoreszenzspektroskopie keine Veränderungen der HS-Strukturen in den gelagerten Wasserproben und ihren Fraktionen auf. Vor-Ort-Strukturuntersuchungen an aquatischen HS sind also kaum erforderlich. Die bezüglich des EDTA- oder Cu(II)-Austausches festgestellten signifikanten Veränderungen natürlicher HS-Metallspezies stehen also kaum im Zusammenhang mit strukturellen Änderungen.

**Tab. 41:** 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie von VM8: Abhängigkeit von der Lagerung

Fraktion	Anregungswellenlänge, nm	Emmissionswellenlänge, nm	Intensität, cps
nach 1 Tag	354	456	$11.3 \cdot 10^6$
	272	463	$7.46 \cdot 10^6$
nach 2 Wochen	354	456	$11.0 \cdot 10^6$
	272	464	$7.42 \cdot 10^6$
nach 4 Wochen	354	454	$11.0 \cdot 10^6$
	272	463	$7.50 \cdot 10^6$

Fluoreszenz unter Inertgas (Ar), Proben temperiert auf 23°C

## 5. Zusammenfassung und Ausblick

Die Huminstoffe (HS) sind komplexe Mischungen sich ähnelnder refraktärer Makromoleküle, die durch mikrobiellen Abbau abgestorbener Biomasse in Böden und Wässern gebildet werden. HS stellen die wichtigste Senke für organischen Kohlenstoff in der Umwelt dar. Auf Grund ihrer strukturellen Vielfalt bzw. Polyfunktionalität sind HS an zahlreichen umweltrelevanten Prozessen beteiligt, insbesondere an starken Wechselwirkungen mit organischen und anorganischen Schadstoffen [6].

Auch in vielen Gewässern besteht ein großer Teil des gelösten und partikulären organischen Kohlenstoffs („DOC“ und „SOC“) aus HS. In Verbindung mit anorganischen Wasserinhaltsstoffen, z.B. Al-, Fe- und Si-Oxidhydraten, können HS komplexe, leicht veränderliche Hydrokolloide bilden, die vermutlich ein hohes Metallbindungsvermögen besitzen [5]. Bisher existieren jedoch nur begrenzt zuverlässige Informationen über organisch geprägte Gewässerkolloide und die von ihnen gebildeten Metallspezies. Die Charakterisierung von HS und ihrem Verhalten in Umweltkompartimenten, z.B. ihre Metallbindungsfomen, hat sich bisher vorwiegend auf isolierte HS, also auf einen operationell wesentlich veränderten „Ausschnitt“ des ursprünglichen Hydrokolloids konzentriert. Hierbei ist prinzipiell unsicher, inwieweit die an artifiziellen HS-Metallkomplexen gewonnenen Erkenntnisse überhaupt auf die ursprünglichen Spezies übertragbar sind. Eine aus diesem Grund wünschenswerte *in-situ*-, zumindest aber Vor-Ort-Analytik an HS und ihren natürlichen Metallspezies in Gewässern war wegen unzureichender Verfahren bisher kaum möglich.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren deshalb Entwicklung, Aufbau und Anwendung einer leistungsfähigen Vor-Ort-Analytik für HS und ihre Metallspezies in huminstoffreichen Gewässern. Mit dieser Zielvorstellung war die Arbeit von 1997 bis 2000 auch eingebunden in das aktuelle DFG-Sonderschwerpunktprogramm ROSIG (Refraktäre organische Säuren in Gewässern) im Bereich der Wasserforschung. Nach der hierbei verfolgten Strategie sollten HS und ihre Metallspezies in ausgesuchten Gewässern mit geeigneten Feldmethoden nach Molekülgröße differenziert, UV/VIS-spektroskopisch charakterisiert und später im Labor mittels Atomspektrometrie, z.B. AAS, ICP-OES oder TRFA, hinsichtlich ihrer Metallgehalte analysiert werden.

Zunächst wurde ein einfaches spektralphotometrisches Feldverfahren zur Bestimmung gelöster HS in Gewässern erarbeitet, auf Basis ihres überraschend wenig schwankenden spektralen Absorptionskoeffizienten (SAK) im UV-Bereich, vorzugsweise dem SAK bei 254 nm. Diese Untersuchungen wurden an zwei typischen Braunwasser-Seen (Hohlohsee (HO), Nordschwarzwald; Venner Moor (VM), Münsterland) und an einem HS-reichen Fließ-

gewässer (Arnsberger Wald (AW), NRW) zu verschiedenen Jahreszeiten durchgeführt. Zum Richtigkeitsvergleich wurden konventionelle DOC-Bestimmungen im Labor herangezogen. Hierzu diente ein nachweisstarker thermographischer Kohlenstoff-Analysator.

Von besonderer Relevanz war eine zuverlässige Größenklassierung der vorliegenden Gewässerkolloide, wobei deren physikalischer Zustand möglichst nicht durch Elektrolyte bzw. Puffer verändert werden sollte. Hierfür wurde eine mobile MST-UF-Einheit entwickelt, die einfache und gut reproduzierbare on-line Fraktionierungen der zu untersuchenden HS-Kolloide vom subpartikulären ( $< 0.45$  bis  $0.1 \mu\text{m}$ ) bis makromolekularen Bereich ( $> 100$  bis  $< 3 \text{kDa}$ ) ermöglichte. Die mit dieser Methodik untersuchten Kolloide wiesen meist Fraktionen von weniger als 10 % DOC-Anteil im subpartikulären Bereich auf, jedoch relativ hohe DOC-Anteile von über 50 % im niedermolekularen Bereich von  $< 3 \text{kDa}$  auf.

Die natürlichen Metallspezies in den so gewonnenen HS-Größenfraktionen, z.B. die von Al, Ca, Cu, Fe, Mg, Mn, Pb und Zn, die im Labor vorzugsweise mittels ICP-OES analysiert wurden, zeigten auffällig unterschiedliche Verteilungsmuster. Sie waren häufig im Größenbereich von 10 bis 100 kDa angereichert (z.B. AW, VM), teilweise jedoch auch im subpartikulären Bereich (z.B. HO), wobei Metallgehalte von 1 bis 100  $\mu\text{g}/\text{mg}$  DOC festzustellen waren.

Signifikante strukturelle Unterschiede in den HS-Größenfraktionen, die zu diesem Zweck mittels  $^1\text{H-NMR}$ - und 2D-Fluoreszenz-Spektroskopie untersucht wurden, waren kaum zu beobachten. Lediglich ihr Absorbanzverhältnis  $A_{254}/A_{436}$ , zeigte eine gewisse Steigerung mit abnehmender Molekülgröße.

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war es, natürliche Metallspezies in huminstoffreichen Gewässern vor Ort nach ihrer thermodynamischen und kinetischen Stabilität zu differenzieren. Zur Unterscheidung zwischen HS-gebundenen und freien Metallfraktionen diente eine einfach durchführbare Feldtechnik auf Basis der Tangentialfluß-UF. Die so ermittelbaren konditionellen thermodynamischen Stabilitätskonstanten  $K_f$  natürlicher HS-Metallspezies lagen meist im Bereich von  $10^3$  bis  $10^6 \text{L}/\text{mol}$ , je nach Element.

Die kinetische Stabilität der vorliegenden HS-Metallspezies wurde operationell durch einen konkurrierenden Austausch mit starken Liganden, z.B. EDTA, und Metallionen, z.B. Cu(II), vor Ort charakterisiert. Der Verlauf der Austauschreaktionen konnte durch zeitkontrollierte Tangentialfluß-UF mit einer zeitlichen Auflösung von zwei Minuten verfolgt werden.

Die vor Ort untersuchten natürlichen Metallspezies, z.B. die von Al, Fe, Mn, Zn und Erdalkalien, tauschten mit EDTA nur relativ langsam aus, wobei die Gleichgewichte häufig erst nach 1000 bis 1500 Minuten erreicht wurden. Ihre Austauschkinetik folgte zwei Geschwindigkeitsschritten erster Ordnung, die z.B. beim Fe mit Halbwertszeiten  $t_{1/2}$  von 0.12 bis 0.39 h<sup>-1</sup> bzw. 1.35 bis 46.2 h<sup>-1</sup> abliefen. Auch bei EDTA-Überschuß erwiesen sich die untersuchten Metallspezies, z.B. die von Al und Fe, nur als teilweise austauschfähig, im Gegensatz zu artifiziellen, aus isolierten HS und Metallionen *in-vitro* gebildeten Spezies. Zudem konnte gezeigt werden, daß natürliche HS-Metallspezies, die nach ihrer Voranreicherung mittels UF für längere Zeit gelagert werden, stark an Metall-Verfügbarkeit verlieren.

Die Verfügbarkeit von Metallen in natürlichen aquatischen Metallspezies wurde am Gewässer auch durch Austauschversuche mit Cu(II)-Ionen untersucht. Beladungen der vorliegenden HS mit hohen Konzentrationen an Cu(II) (oder auch anderen Metallionen) und nachfolgende Me-HS/Me-Trennung mittels zeitkontrollierter TF-UF ermöglichten zunächst die Ermittlung konditioneller Komplexierungskapazitäten, die für die untersuchten Metallionen zwischen 0.1 für Mn(II) über 1.1 für Cu(II) bis hin zu 4.66 mmol/g DOC für Fe(III) differierten. Damit konnte klar belegt werden, daß mit der sonst üblichen Angabe der Cu(II)-Komplexierungskapazität das Metallbindungsvermögen von aquatischen HS nur unzureichend beschrieben ist. Aus den Beladungsgleichgewichten der HS bei niedrigen Metallkonzentrationen konnten außerdem konditionelle Stabilitätskonstanten  $K_f$  für die gebildeten Komplexe ermittelt werden.

Der Austausch zwischen natürlichen HS-Metallspezies und konkurrierenden Cu(II)-Ionen erreichte innerhalb von zehn Minuten sein Gleichgewicht, also wesentlich schneller als der EDTA-Austausch. Allerdings lag die Al- bzw. Fe-Verfügbarkeit der untersuchten Spezies gegenüber Cu(II) mit 16-69 bzw. 2-27 % meist deutlich niedriger als die EDTA-Verfügbarkeit. Nach dem MWG konnte der Austausch zwischen den natürlichen HS-Spezies und zugesetzten Cu(II)-Ionen mit Hilfe von Austauschkonstanten  $K_a$  anschaulich beschrieben werden. Die so in verschiedenen Wasserproben ermittelten  $K_a$ -Werte lagen häufig im Bereich zwischen 0.01 für z.B. Al und Fe und 90 für z.B. Ca. Demnach lag die thermodynamische Stabilität der austauschfähigen natürlichen Al- bzw. Fe-Spezies etwa um den Faktor 100 höher, die der natürlichen Ca-Spezies etwa um den Faktor 100 niedriger als die des gebildeten HS-Cu(II)-Komplexes. Allerdings ergaben sich teilweise signifikante Unterschiede zwischen den untersuchten Wasserproben. Ein vergleichender Cu(II)-Austausch an natürlichen, durch UF vorangereicherten und artifiziellen Metallspezies desselben aquatischen HS (HO17) belegte außerdem erhebliche Unterschiede sowohl

zwischen Metallaustausch durch Cu(II) (Ca, Mg und Sr ausgenommen), als auch in den betreffenden Austauschkonstanten  $K_a$ .

Vor-Ort-Beladungen naturbelassener HS mit Mischungen verschiedener Metallionen wie Al(III), Cd(II), Cu(II), Fe(III), Mn(II), Ni(II), Pb(II), Zn(II) zeigten auf, daß diese nur wenig kompetitiv wirken, vorausgesetzt die Gesamtbeladung des HS bleibt weit unterhalb seiner Komplexierungskapazität.

Die Erfassung möglicher Metallspezies-Transformationen in HS-reichen Wasserproben während ihrer Lagerung (0.45 µm-filtriert, 15 °C, Dunkelheit) war ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit. Hierzu wurden die vor Ort gewonnenen Analysendaten dieser Proben auf etwaige Veränderungen während ihrer Lagerung untersucht. Praktisch keine Veränderungen ergaben sich bei den reinen Größenverteilungen der untersuchten Hydrokolloide, die sich auch nach vier Wochen Lagerung als unerwartet stabil erwiesen. Dies galt auch für die Gesamt-DOC-, weniger aber für die Fe- und Zn-Gehalte. Erhebliche Einbußen waren schon nach einer Woche bei der konditionellen  $KK_{Cu(II)}$  zu verzeichnen, trotz stabil gebliebener DOC-Werte. Signifikanten Veränderungen waren auch die natürlichen Metallspezies in den gelagerten Wasserproben hinsichtlich EDTA- und Cu(II)-Austausch unterworfen. Die Austauschfähigkeit nahm in der Regel deutlich ab, in Einzelfällen (HO16) aber auch deutlich zu. Bei den Cu(II)-Austauschkonstanten  $K_a$  der untersuchten Metallspezies waren ähnlich auffallende Veränderungen zu beobachten, aus denen, je nach Probe und betrachtetem Metall, eine formale Minderung aber auch eine Steigerung der Speziesstabilität relativ zum Cu(II) abzuleiten war. Strukturelle Transformationen der gelagerten HS waren jedoch weder mittels  $^1H$ -NMR noch 2D-Fluoreszenz nachweisbar.

Die hier festgestellten Veränderungen in gelagerten Wasserproben untermauern also im nachhinein die Notwendigkeit, aquatische HS und ihre Metallspezies möglichst schon direkt am Gewässer zu charakterisieren, um unerwünschte Artefakte und damit verbundene Interpretationsfehler zu vermeiden.

Allerdings erlaubt der mit dem hier beschriebenen Vor-Ort-Instrumentarium erarbeitete, noch relativ beschränkte Datenpool über hydrokolloidale Metallspezies in Gewässern noch keine verallgemeinernden Aussagen über ihre Eigenschaften und ihre Varietät. Wünschenswert ist künftig eine Absicherung der hier erarbeiteten Feld-Verfahren im Labor durch geeignete Referenzverfahren, z.B. HP-GPC gekoppelt mit ICP-MS. Ein solcher Vergleich soll Gegenstand einer weiterführenden Arbeit an aquatischen HS-Metallspezies werden.

## 6. Geräte- und Chemikalienliste

### *Diverse Geräte*

Seraldest SD 2000 Varia, Seral, Ransbach-Baumbach, Deutschland  
µ-Waage Toledo UMT5 comparator (Meßbereich 0.1 µg – 5.1 g), Mettler-Toledo AG, Greifensee, Schweiz  
pH-Meter E512, Metrohm AG, Herisau, Schweiz  
pH-Meter CG817, Schott, Mainz, Deutschland  
pH-Elektrode Orion 7110 SC, Schott, Mainz, Deutschland  
Flammen-Atomabsorptionsspektrometer SP9, Pye Unicam, Kassel, Deutschland  
Graphitofen-Atomabsorptionsspektrometer Zeemann/3030, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland  
Induktiv gekoppeltes Plasmaspektrometer IRIS/AP, TJA, Franklin MA, USA  
Energiedispersives Röntgenfluoreszenz-Spektrometer QX-2000, High Wycombe, England  
UV/VIS-Spektrometer Cary 3E, Varian, Darmstadt, Deutschland  
mobiles UV/VIS-Spektrometer Spekol 1200, Analytik Jena GmbH, Jena, Deutschland  
NMR-Spektrometer GX 400, JEOL, Tokyo, Japan  
Fluoreszenz-Spektrometer Spex Fluoromax, Instruments SA, München, Deutschland  
FTIR-Spektrometer PE 2000R, Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland  
C-Analysator, Eigenbau ISAS, Dortmund, Deutschland  
Sinus-Wechselrichter (12V-220V, 150W) Piccolo, ASP AG, Laupen, Schweiz  
Peristaltische Pumpe, Minipuls 2 Gilson, Kontron GmbH, Eching b. München, Deutschland  
Schlauchpumpe, Millipore, Eschborn, Deutschland  
Filtrationsgerät für 0.45-Filtration, Sartorius, Göttingen, Deutschland  
Sartocon Micro; Crossflow-cells, Sartorius, Göttingen, Deutschland  
Pellicon-System; Kassette n.m.w.cut-off: 1 kDa, Millipore, Eschborn, Deutschland  
Ultrasart X; Spiral flow cell, Sartorius, Göttingen, Deutschland  
Flachmembranen OMEGA; Durchmesser 47 mm;  
n.m.w.cut-off: 1,3,5,10,50,100 kDa; Pall Filtron, Dreieich, Deutschland  
Flachmembranen; Durchmesser 47 mm ; 0.10, 0.22 und 0.45 µm; Millipore, Eschborn, Deutschland  
Ultrafiltrationsmodul; Lumen 0.5 mm; 1 und 3 kDa; Schleicher&Schuell, Dassel, Deutschland  
Ultrafiltrationskassette; 5 SQ.FT., Nova 1 kDa, Pall Filtron, Dreieich, Deutschland



## **Chemikalienliste**

Zum Ansetzen der Lösungen wurden deionisiertes Wasser und ausschließlich Reagenzien der Qualität „pro Analyse“, mit Ausnahme von HNO<sub>3</sub> „subboiled“, verwendet.

CaCO<sub>3</sub>, Merck, [102076]

CH<sub>3</sub>OH, Merck, [106009]

(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO, Merck, [100014]

D<sub>2</sub>O, Aldrich, [15,188-2]

EDTA Titriplex III, Merck, [108418]

Extran AP15 alkalisch, Merck, [107575]

HCl 37 %, Merck, [113386]

HNO<sub>3</sub> 65 %, Merck, [100452]

HNO<sub>3</sub> subboiled, hergestellt durch subboiling von HNO<sub>3</sub> 65 %, Merck, [100452]

ICP-Mehrelement-Standardlösung IV, Merck, [111355]

Körbkkatalysator, Merck, [108458]

NaNO<sub>3</sub>, Merck, [106537]

NaOH, Merck, [106495]

Titrisol Al<sup>3+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109967]

Titrisol Ca<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109943]

Titrisol Cd<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109960]

Titrisol Co<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109986]

Titrisol Cr<sup>3+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109948]

Titrisol Cu<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109987]

Titrisol Fe<sup>3+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109972]

Titrisol K<sup>+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109924]

Titrisol Mn<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109988]

Titrisol Mg<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109949]

Titrisol Na<sup>+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109927]

Titrisol Ni<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109989]

Titrisol Pb<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109969]

Titrisol Sr<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109993]

Titrisol Zn<sup>2+</sup>-Standardlösungen, 1.000g ± 0.002g, Merck, [109953]

Titrisol Puffer pH 4, Merck, [109884]

Titrisol Puffer pH 6, Merck, [109886]

Titrisol Puffer pH 8, Merck, [109888]

3-(Trimethylsilyl)propionat-2,2,3,3-d<sub>4</sub> (Na<sup>+</sup>-Form), Aldrich, [26,991-3]

XAD 8 Austauschharz, Serva Feinbiochemica, [42861.01]

## 7. Literaturverzeichnis

---

- [1] M. Kawahigashi, N. Fujitake and T. Takahashi, "Structural information obtained from spectral analysis (UV-VIS, IR, <sup>1</sup>H-NMR) or particle size fractions in two humic acids", *Soil Sci. Plant Nutr.*, 42, (1996) 336-355
- [2] M.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm and R.S. Swift, "Humic Substances II, In Search of Structure", 1. Edition, John Wiley & Sons, Chichester, (1989) 476-496
- [3] G.R. Aiken, D.M. McKnight, R.L. Wershaw and P. MacCarthy (eds.), "Humic substances in soil, sediment and water", John Wiley & Sons, New York, (1985)
- [4] F.J. Stevenson, "Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions", 2. Edition, John Wiley & Sons, New York, (1994)
- [5] J. Buffle and G.G. Leppard, "Characterization of aquatic colloids and macromolecules. 1. Structure and behavior of colloidal material", *Environ. Sci. Technol.*, 29, (1995) 2169-2175
- [6] F.H. Frimmel and R.F. Christman (eds), "Humic Substances and their role in the Environment", John Wiley & Sons, New York, (1988)
- [7] N. Senesi and T.M. Miano (eds), "Humic Substances in the global environment and implications on human health", Elsevier, Amsterdam, (1994) 579-584
- [8] R. Kuckuk, W. Hill, J. Nolte and A. Davies, "Preliminary Investigations into the Interactions of Herbicides with Aqueous Humic Substances", *Pestic. Sci.*, 51, (1997) 450-454
- [9] A. Torrents, S. Jayasundera and W.J. Schmidt, "Influence of the Polarity of Organic Matter on the sorption of Acetamide Pesticides", *J. Agric. Food Chem.*, 45, (1997) 3320-3325
- [10] J.H. Weber, "Binding and transport of metals by humic materials", in: F.H. Frimmel and R.F. Christmann, "Humic substances and their role in the environment", John Wiley & Sons, Chichester, (1988) 165-178
- [11] J.A. Leenheer, G.K. Brown, P. MacCarthy and S.E. Cabaniss, "Models of Metal Binding Structures in Fulvic Acid from the Suwannee River, Georgia", *Environ. Sci. Technol.*, 32, (1998) 2410-2416
- [12] W. Hummel, M.A. Glaus and L.R. Van Loon, "Complexation of Radionuclides with Humic Substances: The Metal Concentration Effect", *Radiochim. Acta*, 84, (1999) 111-114
- [13] F.H. Frimmel and W. Hopp, "Stability spectra for the description of copper-humic complexes", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 325, (1986) 68-72
- [14] J.A. Marinsky and J. Ephraim, "A unified Physicochemical Description of the Protonation and Metal Ion Complexation Equilibria of natural organic Acids. 1. Analysis of the Influence of polyelectrolyte Properties on Protonation Equilibria in Ionic Media: Fundamental Concepts", *Environ. Sci. Technol.*, 20, (1986) 349-354

- 
- [15] B. Aster, "Fraktionierung und Charakterisierung von aquatischen Huminstoffen und ihren Metallspezies: Untersuchungen mittels Mehrstufen-Ultrafiltration, Metallaffinitäts-Chromatographie sowie Austauschreaktionen", Logos-Verlag, Berlin, bzw. Dissertation, Universität Dortmund, (1999)
- [16] K.J. Wilkinson, J.-C. Nègre and J. Buffle, "Coagulation of colloidal material in surface waters: the role of natural organic matter", *J. of Contam. Hydrol.*, 26, (1997) 229-243
- [17] R.L. Malcolm, "Factors to be considered in the isolation and characterization of aquatic humic substances", in: B. Allard, H. Boren and A. Grimvall (eds.), "Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment", Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York London, (1991) 9-36
- [18] P. Burba, "Analytik von aquatischen Huminstoffen und ihren Prozessen", *Nachr. Chem. Tech. Lab.*, 46, Nr. 4, (1998) 426-430
- [19] P. Burba, "Zur Analytik von Huminstoffen und ihren Metallspezies in Gewässern", *Analytiker Taschenbuch*, Bd. 20, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, (1998)
- [20] P. Burba, B. Aster, T. Nifanteva, V. Shkinev and B.Ya. Spivakov, "Membrane filtration studies of aquatic humic substances and their metal species: A concise overview. Part 1. Analytical fractionation by means of sequential-stage ultrafiltration", *Talanta*, 45, (1998) 977-988
- [21] P. Burba, J.C. Rocha and D. Klockow, "Labile complexes of trace metals in aquatic humic substances: Investigations by means of an ion exchange-based flow procedure", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 349, (1994) 800-807
- [22] J.Y. Lu, C.L. Chakrabarti, M.H. Back and A.L.R. Sekaly, "Speciation of some Metals in River Surface Water, Rain and Snow, and the Interactions of these with Selected Soil Matrices", *J. of Anal. Atomic Spectr.*, 11, (1996) 1189-1201
- [23] H.M.V.M. Soares and M.T.S.D. Vasconcelos, "Study of the lability of copper(II)-fulvic acid complexes by ion selective electrodes and potentiometric stripping analysis", *Anal. Chim. Acta*, 293, (1994) 261-270
- [24] G.Abbt-Braun, U. Schmiedel und F.H. Frimmel, "Elementaranalytische Untersuchungen isolierter Fulvinsäuren unterschiedlichen Ursprungs", *Vom Wasser*, 75, (1990) 59-73
- [25] N. Havers, "Isolierung und Charakterisierung von Huminstoff-ähnlichen Substanzen im partikelförmigen atmosphärischen Aerosol", Dissertation, Universität Dortmund, (1999)
- [26] J.A.E. Buffle, "Les substances humiques et leurs interactions avec les ions minereaux", in conference proceedings de la commission d'hydrologie applique de l'A.G.H.T.M., L'universite d'Orsay, (1977) 3-10
- [27] M. Schnitzer, "Humic substances: chemistry and reactions", in: M. Schnitzer and S.U. Kahn, eds., *Soil organic matter*, Elsevier, New York, (1978) 1-64

- 
- [28] H.-R. Schulten und P. Leinweber, "Characterization of humic and soil particles by analytical pyrolysis and computer modelling", *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 38, (1996) 1-38
- [29] D. Kleinhempel, "Theory of the condition of humic substances", *Albrecht-Thaer-Arch.*, 14, (1970) 3-14
- [30] J. Buffle, "Complexation Reactions in Aquatic Systems -An Analytical Approach", Ellis Horwood Publ., Chichester, (1998)
- [31] M. Hesse, H. Meier und B. Zech, "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, (1987)
- [32] Y. Chen, N. Senesi und M. Schnitzer, "Information provided on humic substances by E4/E6 ratios", *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 41, (1977) 352-358
- [33] G. Abbt-Braun, "Spectroscopic characterization of humic substances in the ultraviolet and visible region and by infrared spectroscopy", in: G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz and E. Usdowski (eds.), "Progress in Hydrogeochemistry", Springer-Verlag, New-York, (1992) 29-36
- [34] P.W. Atkins, *Physikalische Chem.*, 1. Auflage, VCH Verlag, Weinheim (1987)
- [35] H. Naumer und W. Heller, "Untersuchungsmethoden in der Chemie", 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New-York, (1997)
- [36] A. Streitwieser, C.H. Heathcock and E. M. Kosower, "Introduction to organic chemistry", 4. Edition, (1992)
- [37] F.H. Frimmel, "Investigations of metal complexation by polarography and fluorescence spectroscopy", in: G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz and E. Usdowski (eds.), "Progress in Hydrogeochemistry", Springer-Verlag, New-York, (1992) 61-65
- [38] E.M. Filippova, V.V. Faeev and V.V. Chubarov, "The origin and structure of fluorescence band from aquatic humic substances", *Laser Appl. Life Sci.*, SPIE 2370, (1994) 651-655
- [39] M. Ewald, C. Belin, P. Berger and J.H. Weber, "Corrected fluorescence spectra of fulvic acids isolated from soil and water", *Environ. Sci. Technol.*, 17, (1983) 501-503
- [40] M.A. Wilson, A.H. Gollam and P.J. Collin, "Analysis of the structures of dissolved humic substances and their phytoplanktonic precursors by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR", *Chem. Geol.*, 40, (1983) 187-201
- [41] T. Yokoyama, H. Abe, T. Kurisaki and H. Wakita, " $^{13}\text{C}$  and  $^{27}\text{Al}$  NMR Study on the Interaction in Acidic Aqueous Solution between Aluminium Ion and Tiron, Salicylic Acid and Phthalic Acid as Model Compounds with Functional Groups of Fulvic Acid", *Anal. Sci.*, 13, (1997) 425-428
- [42] F.J. Stevenson, "Humus Chemistry, Genesis, Composition, Reactions", 2. Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, (1994) 249-277

- 
- [43] S. Haiber, "Quantifizierung von Partialstrukturen in Erdölen und aquatischen Huminstoffen durch  $^1\text{H}$ - und  $^{13}\text{C}$ -NMR-Spektroskopie", Logos-Verlag, Berlin, bzw. Dissertation, Universität Dortmund, (1999)
- [44] J. Buddrus, P. Burba, H. Herzog and J. Lambert, "Quantification of partial structures of aquatic humic substances by one- and two-dimensional solution  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 61, (1989) 628-631
- [45] J. Lambert, P. Burba, J. Buddrus, "Quantification of partial structures in aquatic humic substances by volume integration of two-dimensional solution  $^{13}\text{C}$  Nuclear Magnetic Resonance Spectra. Comparison of one- and two-dimensional spectra", *Magn. Reson. Chem.*, 30, (1992) 221-227
- [46] H. Günther, "NMR-Spektroskopie, Grundlagen, Konzepte und Anwendungen", 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, New York, (1992)
- [47] A. Pines, M.G. Gibby and J.S. Waugh, "Proton enhanced nuclear magnetic resonance of dilute spins in solids", *J. Chem. Phys.*, 59, (1973) 569-590
- [48] H.R. Schulten and C. Sorge, "Pyrolysis methylation-mass spectrometry of whole soils", *Eur. J. Soil Sci.*, 46, (1995) 567-579
- [49] L. Beyer, "Soil organic matter composition of spodic horizons in podzols of the Northwest German Lower plain", *Sci. Total. Environ.*, 181, (1996) 167-180
- [50] G.R. Aiken, P.A. Brown, T.I. Noyes and D.J. Pinckney, "Molecular size and weight of fulvic and humic acids from the Suwannee river", In: R.C. Averett, J. A. Leenheer, D.M. McKnight and K.A. Thorn (eds.), "Humic substances in the Suwannee river, Georgia: Interactions, Properties, and proposed Structures", Geological Survey, (1989) 167-174
- [51] J.A. Marinsky and M.M. Reddy, "Vapor-pressure osmometric study of the molecular weight and aggregation tendency of a reference-soil fulvic acid"; *Anal. Chim. Acta*, 232, (1990) 123-130
- [52] G.R. Aiken and A.H. Gillam, "Determination of molecular weights of humic substances by colligative property measurements", In: M.H.B. Hayes, P. McCarthy, R.L. Malcolm and R.S. Swift (eds.); "Humic Substances II: In Search of Structure", Wiley, Chichester, (1989) 515-542
- [53] R.L. Wershaw, P.J. Burcar, C.L. Sutula and B.J. Wiginton, "Sodium humate solution studied with small-angle x-ray scattering", *Science*, 157, (1967) 1429-1431
- [54] D.B. Wagoner, R.F. Christman, G. Cauchon and R. Paulson, "Molar mass and size of Suwannee river natural organic matter using multi-angle laser light scattering", *Environm. Sci. Technol.*, 31, (1997) 937-941
- [55] I.V. Perminova, F.H. Frimmel, D.V. Kovalevskii, G. Abbt-Braun, A.V. Kudryavtsev and S. Hesse, "Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances", *Wat. Res.*, 32, (1998) 872-881

- 
- [56] H. Matsubara and K. Urano, "Measurement of molecular weight distribution of humic substances with untreated Sephadex G-15 and ammon-treated Sephadex G-15", *Chemosphere*, 29, (1994) 485-494
- [57] R.S. Swift, "Molecular weight, shape and size of humic substances by ultracentrifugation", in: M.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm and R.S. Swift, "Humic Substances II, In Search of Structure", 1. Edition, John Wiley, Chichester, (1989) 476-496
- [58] S. Sipos, E. Sipos, I. Dekany, F. Szanto and B. Lakatos, "Investigation of humic acids and metal humates with analytical ultracentrifuge", *Acta Phys. Chem.*, 18 (1972) 253-257
- [59] F.J. Stevenson, "Humus chemistry- Genesis, Composition, Reactions", John Wiley, New York, (1994) 325-349
- [60] S.A. Visser, "A physico-chemical study of the properties of humic acids and the changes during humification", *J. Soil Sci.*, 15, (1964) 202-219
- [61] D.S. Orlov, I.A. Amosova and G.I. Glebova, "Molecular parameters of humic acid", *Geoderma*, 13, (1975) 211-229
- [62] R.S. Cameron, B.K. Thornton, R.S. Swift and A.M. Posner, "Molecular weight and shape of humic acid from sedimentation and diffusion measurements on fractionated extracts", *J. Soil Sci.*, 41, (1972) 395-408
- [63] Y. Chen and M. Schnitzer, "Viscosity measurements on soil humic substances", *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 40, (1976) 866-872
- [64] M. Schnitzer, "A chemical structure for humic acid. Chemical,  $^{13}\text{C}$  NMR, colloid chemical, and electron microscopic evidence", In: Senesi N. and Miano T.M. (eds), "Humic substances in the Global Environment and Implications on Human Health", Elsevier Amsterdam, (1994) 57-69
- [65] R.L. Wershaw, "A new model for humic materials and their interactions with hydrophobic organic chemicals in soil-water or sediment-water systems". *J. Contam. Hydrol.*, (1986) 29-45
- [66] P. Barak, and Y. Chen, "Equivalent radii of humic macromolecules from acid-base titration", *Soil Sci.*, 154, (1992) 184-195
- [67] E.M. Thurman and R.L. Malcolm, "Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances", *Environ. Sci. Technol.*, 15, (1981) 463-466
- [68] B. Post and H. Klamberg, "Characterization of humic substances extracted by organic solvents", in: G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz and E. Usdowski (eds.), "Progress in Hydrogeochemistry", Springer-Verlag, New-York, (1992) 56-60
- [69] F.H. Frimmel, "Chromatographic characterization of acid-soluble parts of humic substances", in: G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz and E. Usdowski (eds.), "Progress in Hydrogeochemistry", Springer-Verlag, New-York, (1992) 24-28

- 
- [70] J. Buffle, "Complexation Reactions in Aquatic Systems- An Analytical Approach", Ellis Horwood Publ., Chichester, (1988) 184-185
- [71] J.M. Duxbury, "Studies of the molecular size and charge of humic substances by electrophoresis", in: M.B. Hayes, P. MacCarthy, R.L. Malcolm and R.S. Swift, "Humic Substances II, In Search of Structure", 1. Edition, John Wiley, Chichester, (1989) 257-409
- [72] A.W. Garrison, P. Schmitt and A. Kettrup, "Capillary electrophoresis for the characterization of humic substances", *Water Res.*, 29, No. 9, (1995) 2149-2159
- [73] N. Havers, P. Burba, D. Klockow, and A. Klockow-Beck, "Characterization of humic-like substances in airborne particulate matter by capillary electrophoresis", *Chromatographia*, 47, (1998) 619-624
- [74] R. Beckett, F.J. Wood and D.R. Dixon, "Size and chemical characterization of pulp and paper mill effluents by flow field-flow fractionation and resin adsorption techniques", *Environ. Technol.*, 13, (1992) 1129-1140
- [75] T. Klein and R. Niessner, "Characterization of Heavy-Metal-Containing Seepage Water Colloids by Flow FFF, UF, ELISA and AAS", *Mikrochem. Acta*, 129, (1998) 47-55
- [76] P. Burba, V. Shkinev, and B.Ya. Spivakov, "On-line fractionation and characterization of aquatic humic substances by means of sequential-stage ultrafiltration", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 351, (1995) 74-82
- [77] F.J. Stevenson, "Humus chemistry- Genesis, Composition, Reactions", John Wiley & Sons, New York, (1994) 212-235
- [78] P. Schmitt and A. Kettrup, "Kapillarelektrophorese in der Umweltanalytik", *GIT Fachz. Lab.*, 12, (1994) 1213-1218
- [79] A. Rigol, J.F. Lopez-Sanchez and G. Rauret, "Application of capillary zone electrophoresis to the estimation of the humic acid content in soils", *Quimica Anal.*, 13, (1994) 11-14
- [80] A. Rigol, J.F. Lopez-Sanchez and G. Rauret, "Capillary Zone Electrophoresis of humic acids", *J. Chromatogr.*, 664 A, (1994) 301-305
- [81] G. Woelki, S. Friedrich, G. Hanschmann and R. Salzer, "HPLC fractionation and structural dynamics of humic acids", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 357, (1997) 548-552
- [82] P. Burba und A. Abbatepaulo, "Analytische Abtrennung und Anreicherung von aquatischen Huminstoffen an unterschiedlichen Kollektoren (Anionenaustauscher, XAD 2, XAD 8, metallhydroxidbeladene Cellulose): ein Vergleich", *Vom Wasser*, 75, (1990) 201-213
- [83] P. Burba, B. Jakubowski, R. Kuckuk, K. Küllmer and K.G. Heumann, "Characterization of aquatic humic substances and their metal complexes by immobilized metal-chelate affinity chromatography on iron(III)-loaded ion exchangers", *Fresenius J. Anal. Chem.*, in press

- 
- [84] J. Vogl and K.G. Heumann, "Determination of heavy metal complexes with humic substances by HPLC/ICP-MS coupling using on-line dilution technique", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359, (1997) 438-441
- [85] L. Rottmann and K.G. Heumann, "Determination of heavy Metal Interactions with Dissolved Organic Materials in Natural Aquatic Systems by Coupling a High Performance Liquid Chromatography System with an Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometer", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 66, (1994) 3709-3715
- [86] R. Kuckuk and P. Burba, "Analytical fractionation of aquatic humic substances by metal affinity chromatography on iron(III)-loaded cellulose", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366, (2000) 95-101
- [87] F. Fuchs, "Gelchromatographische Trennung von organischen Wasserinhaltsstoffen", *Vom Wasser*, 64, (1985) 129-144
- [88] O. Francisioso, S. Sanchez-Cortez, V. Tugoli, C. Ciavatta, L. Sitti and C. Gessa, "Infrared, Raman, and Nuclear Magnetic Resonance ( $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , and  $^{31}\text{P}$ ) Spectroscopy in the Study of Fractions of Peat Humic Acids", *Applied Spectroscopy*, 50, (1996) 1165-1174
- [89] A.S. Jönsson and G. Trägårdh, "Fundamental principles of ultrafiltration", *Chem. Eng. Process.*, 27, (1990) 67-81
- [90] J.L. Nilsson, "Protein fouling of ultrafiltration membranes: causes and consequences", *J. of Membrane Science*, 52, (1990) 121-142
- [91] J. Buffle, D. Perret and M. Newman, "The use of filtration and ultrafiltration for size fractionation of aquatic particles, colloids, and macromolecules", in: J. Buffle and H.P. van Leeuwen, *Environ. Particles Vol.1*, Lewis Publ. Boca Raton, (1992) 171-229
- [92] M. Cheryan, "Ultrafiltration and Microfiltration Handbook", Technomic Publishing Company, (1998)
- [93] W.F. Blatt, "Membrane partition chromatography: A tool for fractionation of protein mixtures", *J. Agr. Food Chem.*, 19, (1971) 589-594
- [94] J. Buffle, P. Deladoey and W. Haerdi, "The use of Ultrafiltration for the Separation and Fractionation of organic ligands in fresh waters", *Anal. chim. Acta*, 101, (1978) 339-357
- [95] B. Aster, P. Burba and J.A.C. Broekaert, "Analytical fractionation of aquatic humic substances and their metal species by means of multistage ultrafiltration", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 354, (1996) 722-728
- [96] E.M. Perdue, "Measurements of binding site concentration in humic substances", in: J.R. Kramer, H.E. Allen (eds.), "Metal speciation: Theory, analysis and applications", Lewis Pub., Chelsea (Michigan), (1988) 135-154
- [97] F.H. Frimmel und J. Geywitz, "Zur koordinativen Bindung von Metallionen an Gewässerhuminstoffen", *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 316, (1983) 582-588



- 
- [98] W. Fish and F. Morel, "Propagation of error in fulvic acid titration data: a comparison of three analytical methods", *Can. J. Chem.*, 63, (1985) 1185-1193
- [99] R.G. Smith, "Evaluation of combined applications of ultrafiltration and complexation capacity techniques to natural waters", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 48, (1976) 74-76
- [100] J. Van den Bergh, B. Aster and P. Burba, "Characterization of aquatic humic substance- metal species and their stability by combining EDTA exchange, ultrafiltration and atomic spectrometry", *Conference Proceedings IHSS 9 (1998)*, Adelaide, Australia in press
- [101] G. Marx, "Massenspektrometrische Untersuchungen zum Nachweis kinetisch stabiler Chrom-Huminstoff-Komplexe im Vergleich mit kupferähnlichen Komplexen", *Diplomarbeit Fachbereich Chemie und Pharmazie, J. Gutenberg-Universität Mainz*, (1997)
- [102] F.A. Cotton and G. Wilkinson, *Anorganische Chemie*, VCH Weinheim, (1985) 139-149
- [103] P.J.M. Dycus, K.D. Healy, G.K. Stearman and M.J.M. Wells, *Sep. Sci. Technol.*, 30, (1995) 1435-1453
- [104] J. Buffle and C. Staub, "Measurement of complexation properties of metal ions in natural conditions by ultrafiltration: measurement of equilibrium constants for complexation of zinc by synthetic and natural ligands", *Anal. Chem.*, 56, (1984) 2837-2842
- [105] J. Buffle, "Complexation Reactions in Aquatic Systems- An Analytical Approach", *Ellis Horwood Publ., Chichester*, (1988) 380-426
- [106] A. Beveridge, P. Waller and W.F. Pickering, "Effect of soluble calcium on the determination of the labile metal content of sediments with ion-exchangers", *Talanta* 36, (1989) 1217-1225
- [107] W.J. Moore, "Physical Chemistry", *Prentice Hall, New Jersey*, (1972)
- [108] E.T. Degens and K. Mopper, In: J.P. Reily and R. Chester (eds.), "Chemical Oceanography", *Academic Press, London*, 6, (1976) Chap. 31
- [109] R.L. Malcolm, "U.S. Geological Survey Water-Supply Paper", (1985) 9
- [110] G. Matthes, F.H. Frimmel, P. Hirsch, H.D. Schulz and E. Usdowski, "Progress in Hydrogeochemistry", *Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York*, (1992)
- [111] P. Burba, K.E. Geckeler, J. Mattusch, R. Wennrich, B.Ta. Spivakov and V.M. Shkinev, "On-line Multi-Stage Membrane Filtration Devices Optimized for Analytical Separation of Microparticles and Dissolved Macromolecules", *International Labmate. Vol XXII*, (1997) 24-25
- [112] B. Welz, "Atomabsorptionsspektrometrie", in: *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, 3. erweiterte und neubearbeitete Auflage, *Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York*, (1997) 308-321
- [113] R. Klockenkämper, "Total-Reflection X-ray Fluorescence analysis", *John Wiley & sons, New York* (1997)

- 
- [114] G. Tölg and R. Klockenkämper, "The role of total-reflection X-ray fluorescence in atomic spectroscopy", *Spectrochimica Acta*, 48, (1993) 111-127
- [115] J.A.C. Broekaert, "Atomemissionsspektrometrie", in: *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, 3. erweiterte und neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, (1997) 293-307
- [116] J.A.C. Broekaert, "Atomic spectroscopy", In *Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, VCH Verlag Weinheim, 5, (1994) 559-652
- [117] B. Aster, A. van Bohlen and P. Burba, "Determination of metals and their species in aquatic humic substances by using total-reflection X-ray fluorescence spectrometry", *Spectrochimica Acta Part B*, 52, (1997) 1009-1018
- [118] P. Burba, "Labile/inert metal species in aquatic humic substances- An ion exchange study", *Fresenius J. Anal. Chem.*, 348, (1994) 301-311
- [119] L.G. Sillén and A.E. Martell, "Stability Constants", *Chem. Soc. London, Spec. Pubn.*, 17, (1964)
- [120] Y. Lu, C.L. Chakrabarti, M.H. Back., D.C. Gregoire and W.H. Schroeder, "Kinetic studies of metal speciation using inductively-coupled plasma mass spectrometry", *Inter. J. Environ. Anal. Chem.*, 60, (1995) 313-337
- [121] B.A. Goodman and M.V. Cheshire, "Characterization of Iron-Fulvic Acid Complexes using Mossbauer and EPR Spectroscopy", *Sci. of Tot. Environ.*, 62, (1987) 229-240
- [122] F.H. Frimmel, J. Geywitz and K.-E. Quentin, "Models for iron complexation in aquatic humus", *Vom Wasser*, 57, (1984), 185-198
- [123] J. Vogl and K.G. Heumann, "Development of an ICP-IDMS Method for DOC Determinations and Its Application to Chromatographic Fractions of Heavy Metal Complexes with Humic Substances", *Anal. Chem.*, 70, (1998) 2038-2043
- [124] J.C.G. Esteves da Silva, A.A.S.C. Machado, M.A. Ramos, F. Arce and F. Rey, "Quantitative Study of Be(II) Complexation by Soil Fulvic Acids by Molecular Fluorescence Spectroscopy", *Environ. Sci. Technol.*, 30, (1996) 3155-3160
- [125] H. Geckeis, Th. Rabung and J.I. Kim, "Kinetic Aspects of the Metal Ion Binding to Humic Substances", in: "Effects of Humic Substances on the Migration of Radionuclides: Complexation and Transport of Actinides", G. Buckau (ed.), *Forschungszentrum Karlsruhe, Wissenschaftliche Berichte, FZKA 6324*, (1999)
- [126] F. Vogel, "Wet oxidation of phenol with oxygen under mild conditions", *Fortschr.-Ber. VDI*, 3, (1998) 1-22
- [127] N.I. Tkachenko and N.A. Skachkova, "Accessibility to biological oxidation of products of carbohydrate degradation contained in effluents", *Sulfitno-Spirit. Prom.*, 15, (1996) 238-250