

UNIVERZITET U BEOGRADU  
TEHNIČKI FAKULTET U BORU

Đuro M. Čokeša

**Istraživanje interakcije arsena i huminskih  
kiselina iz zemljišta**

doktorska disertacija

Bor, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
TECHNICAL FACULTY IN BOR

Đuro M. Čokeša

**Investigation of the interaction of arsenic and soil  
humic acids**

Doctoral Dissertation

Bor, 2023.

## **Komisija za pregled i odbranu**

Mentor: *Dr Snežana Šerbula, redovni profesor*  
Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije: *Dr Snežana Milić, redovni profesor*  
Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu

*Dr Marija Petrović Mihajlović, vanredni profesor*  
Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu

*Dr Mirjana Marković, viši naučni saradnik*  
Institut za nuklearne nauke Vinča, Institut od nacionalnog  
značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu

*Dr Svjetlana Radmanović, vanredni profesor,*  
Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Beogradu

*Dr Ana Simonović, docent*  
Tehnički fakultet u Boru, Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane:

## **Zahvalnica**

*Veliku zahvalnost dugujem mentorki prof. dr Snežani Šerbuli, redovnom profesoru Tehničkog fakulteta u Boru, Univerzitet u Beogradu, na bezrezervnoj pomoći, korisnim savetima i sugestijama tokom izrade disertacije.*

*Posebno želim da izrazim svoju zahvalnost dr Mirjani Marković, višem naučnom saradniku Instituta za nuklearne nauke “Vinča”, na uvođenju u problematiku i osmišljavanju teme. Takođe, želim da naglasim da mi je koleginica dr Marković pružila svesrdnu pomoć u eksperimentalnom delu, tumečenju rezultata i pisanju radova proisteklih iz ove doktorske teze.*

*Zahvalnost dugujem članovima komisije, dr Snežani Milić, dr Mariji Petrović Mihajlović, dr Ani Simonović, dr Mirjani Marković i dr Syjetlani Radmanović na saradnji, stručnoj pomoći, kao i na sadržajnim sugestijama pri konačnoj izradi disertacije.*

*Zahvaljujem se sledećim saradnicima koji su mi pružili stručnu pomoć i na taj način značajno upotpunili ovu disertaciju: Vamoš Mihalju, na izradi hardvera za digitalizaciju ITC opreme; Zoranu Toliću, na izradi softvera za praćenje ITC eksperimenata i matematičko modelovanje dobijenih rezultata; kolegama iz Instituta za nuklearne nauke “Vinča” dr Nebojši Potkonjaku, na pomoći pri snimanju i stručnoj obradi rezultata merenja velčine čestica i zeta potencijala i dr Veliboru Andriću, na stručnoj pomoći i savetima.*

*Dr Jeleni Milosavljević i Slobodanu Mančiću sa Tehničkog fakulteta u Boru zahvaljujem se na pomoći u rešavanju administrativnih problema tokom doktorskih studija.*

*Svim saradnicima Laboratorije za hemijsku dinamiku i permanentno obrazovanje Instituta za nuklearne nauke “Vinča” se zahvaljujem na kolegijalnoj podršci.*

*Zahvaljujem se Laboratoriji Miphem doo na materijalnoj i finansiskoj pomoći.*

*Izradu ove doktorske disertacije finansiralo je Ministarstvo nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (evidencioni broj: 451-03-47/2023-01/200017) u okviru programa Životna sredina i zdravlje, tema “Imobilizacija neorganskih i organskih zagađivača zemljišnim huminskim kiselinama” (0602304), kojom rukovodi dr Mirjana Marković.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem svojoj porodici na stalnoj i bezrezervnoj podršci tokom izrade doktorske disertacije.*

*...autor*

## Istraživanje interakcije arsena i huminskih kiselina iz zemljišta

### Sažetak

Proces vezivanja arsenita ( $\text{As}^{3+}$ ) i huminskih kiselina (HA) izolovanih iz različitih tipova zemljišta (TCHA-iz tehnosola, LPHA i ESHA-iz različitih tipova zemljišta koji nisu tehnogenog porekla) ispitivan je korišćenjem tehnika izotermalne titracione kalorimetrije (ITC), dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS) i laserske Doppler elektroforeze (LDE). Na osnovu vrednosti koeficijenta korelacije  $R^2$  (0,996–0,936), očigledno je da su podaci dobijeni ITC merenjima uspešno interpretirani primenom teorijskog modela višestrukih nereagujućih mesta (MNIS – Multiple Non-Interacting Sites), što je omogućilo određivanje termodinamičkih parametara vezivanja. MNIS model je prilagođen procesu vezivanja arsenit-HA pod pretpostavkom da je vodonična veza dominantna vrsta interakcije u sistemu. Negativne vrednosti promene entalpije ( $\Delta H$ ) u opsegu od -15,64 do -18,96  $\text{kJ mol}^{-1}$  pokazale su da je vezivanje arsenita i HA egzotermni proces. Negativne vrednosti  $\Delta G$  (-26,83–27,00)  $\text{kJ mol}^{-1}$  su ukazale na spontanost reakcije vezivanja, koja dovodi do formiranja kompleksa arsenit-HA. Vrednosti konstante vezivanja ( $(7,57-5,02)10^5 \text{ M}^{-1}$ ) nedvosmisleno pokazuju izražen afinitet vezivanja. Kako su vrednosti entropijskih promena ( $\Delta S$ ) očigledno pozitivne (0,027–0,041), ali bliske nuli, i kako su apsolutne vrednosti entalpijskih promena veće od entropijskih ( $\Delta H > \Delta S$ ), reakcija vezivanja arsenita i ispitivanih huminskih kiselina se može smatrati entalpijski vođenom. S obzirom da se tipična jačina vodonične veze nalazi u opsegu od 10 do 40  $\text{kJ mol}^{-1}$ , dobijene reakcione toplote, odnosno vrednosti  $\Delta H$  (-15,64–18,96)  $\text{kJ mol}^{-1}$  potvrdile su da su vodonične veze najzastupljeniji tip interakcije u kompleksu arsenit-HA.

Vrednost stehiometrijskog odnosa ( $n$ ) arsenita i huminskih kiselina u kompleksu  $\text{As}^{3+}$ -HA najveća je za LPHA. Neočekivano, stehiometrijski odnos za kompleks  $\text{As}^{3+}$ -TCHA je veći u odnosu na  $\text{As}^{3+}$ -ESHA, što je najverovatnije posledica postojanja drugih vrsta interakcija pored predpostavljene vodonične veze, kao što su, npr., Van der Waals-ove.

Negativne vrednosti zeta potencijala (-45–20) mV pokazale su da su agregati arsenit-HA ostali negativno naelektrisani u celom opsegu molarnog odnosa naelektrisanja. Promena veličine agregata HA je očigledna, ali nije posebno izražena ( $Z_{av} = 50-80 \text{ nm}$ ). Može se pretpostaviti da agregacija tokom procesa titracije nije izražena zbog odbojnih sila između negativno naelektrisanih čestica arsenit-HA.

Na osnovu rezultata merenja zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica ispitivanih huminskih kiselina u odsustvu arsenita, očigledno je da se LPHA razlikuje od TCHA i ESHA. U intervalu pH od 2 do 9 vrednosti ZP za LPHA su izrazito negativnije u celom opsegu pH (-20–35 mV), dok se ZP vrednosti za TCHA i ESHA u istom intervalu pH nalaze u opsegu od -10 do -25 mV. Vrednosti hidrodinamičkog prečnika za sve tri ispitivane huminske kiseline u opsegu pH od 4 do 10 bliske su nuli, odnosno agregacija nije uočena. Pri pH vrednostima ispod 3 evidentna je izražena agregacija, pri čemu se najveći agregati formiraju u slučaju LPHA (oko

10000 nm), a najmanji za TCHA (oko 4000 nm). Ove razlike su najverovatnije uslovljene različitim sadržajima funkcionalnih grupa ispitivanih kiselina.

Termodinamički i reakcioni parametri jasno pokazuju da se kompleksi arsenit-HA formiraju pri uobičajenim pH vrednostima zemljišta, što potvrđuje mogući uticaj huminskih kiselina na povećanu pokretljivost arsena i njegovu smanjenu bioraspoloživost.

**Ključne reči:** Huminska kiselina, Arsenit, Termodinamički parametri, MNIS model, Zeta potencijal, Veličina agregata

**Naučna oblast:** Tehnološko inženjerstvo

**Uža naučna oblast:** Hemija, hemijska tehnologija i hemijsko inženjerstvo

**UDK broj:** 502/504(043.3)

547.992(043.3)

661.641(043.3)

544.638(043.3)

543.2(043.3)

## Investigation of the interaction of arsenic and soil humic acids

### Abstract

The arsenite-humic acid (HA) binding process was investigated using Isothermal Titration Calorimetry (ITC), Dynamic Light Scattering (DLS), and Laser Doppler Electrophoresis (LDE) techniques. Humic acids were isolated from various soil types (TCHA from tehno soil, LPHA and ESHA from natural soils of various origins). The ITC data were successfully ( $R^2 = 0.996\text{--}0.936$ ) interpreted by applying the MNIS theoretical model (MNIS-Multiple Non-Interacting Sites), enabling thermodynamic parameters to be determined. The MNIS model was adjusted to the arsenite-HA binding process assuming that hydrogen bonding is the dominant type of interaction in the system. Negative enthalpy change values ( $-(15.64\text{--}18.96)$  kJ mol<sup>-1</sup>) indicated the arsenite-HA binding as an exothermic process. Negative  $\Delta G$  values ( $-(26.83\text{--}27.00)$  kJ mol<sup>-1</sup>) pointed out to spontaneous binding reaction, forming the arsenite-HA complexes. The binding constant values ( $(7.57\text{--}5.02) 10^5$  M<sup>-1</sup>) clearly demonstrated pronounced binding affinity. As  $\Delta S$  values are obviously positive ( $0.027\text{--}0.041$  kJ mol<sup>-1</sup>) but close to zero, and  $\Delta H > \Delta S$ , the reaction can be considered enthalpy driven. As typical hydrogen bond strength ranges from 10 to 40 kJ mol<sup>-1</sup>, obtained reaction heats, and  $\Delta H$  values ( $-(15.64\text{--}18.96)$  kJ mol<sup>-1</sup>) confirmed hydrogen bonds as the most ascendant interaction type in the arsenite-HA complex.

Arsenite and HA stoichiometric ratio ( $n$ ) value in the As<sup>3+</sup>- HA complex is the highest for LPHA (0.694). Unexpectedly, the stoichiometric ratio for the As<sup>3+</sup>- TCHA complex is higher in comparison to the As<sup>3+</sup>- ESHA, the difference likely caused by the presence of other interaction types (i.e. Van der Waals) besides assumed hydrogen bonds.

Negative zeta potential values ( $-45$  to  $-20$  mV) had shown that arsenite-HA aggregates remained negatively charged in the whole molar charge ratio range. The HA aggregate size change is evident but not particularly pronounced ( $Z_{av} = 50\text{--}180$  nm). It can be speculated that aggregation during the titration process is not expressive due to repulsive forces between negatively charged arsenite-HA particles.

Considering the results of zeta potential and HA average hydrodynamic diameter measurements in the absence of arsenite, it is obvious that LPHA differs from TCHA and ESHA. In the 2-9 pH range, ZP values are distinctly higher for LPHA ( $-20$  to  $-35$  mV) compared to TCHA and ESHA ( $-10$  to  $-25$  mV) in the same pH interval. The average hydrodynamic diameter values for all investigated HA in the 4-10 pH range are close to zero, i.e. aggregation was not evident. At  $\text{pH} < 3$  pronounced aggregation is obvious, forming the largest aggregates for LPHA (approx. 10000 nm), and the smallest for TCHA (approx. 4000 nm). These differences are probably influenced by various HA functional group contents.

Thermodynamic and reaction parameters clearly indicated that arsenite-HA complexes are formed at common soil pH values, confirming the possible influence of humic acids on increased As mobility and its reduced bioavailability.

**Keywords:** Humic acid, Arsenite, Thermodynamic parameters, MNIS model, Zeta potential, aggregate size

**Scientific field:** Technological engineering

**Scientific subfield:** Chemistry, chemical technology and chemical engineering

**UDC number:** 502/504(043.3)

547.992(043.3)

661.641(043.3)

544.638(043.3)

543.2(043.3)



## SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OSOBINE HUMINSKIH KISELINA (HA)	4
3. VEZIVANJE JONA METALA HUMINSKIM KISELINAMA	10
4. TERMODINAMIČKA ISPITIVANJA VEZIVANJA JONA METALA HUMINSKIM KISELINAMA	14
4.1. Termodinamička ispitivanja utvrđivanjem ravnotežnih izoterma	14
4.2. Termodinamička ispitivanja merenjem toplotnih promena	16
4.2.1. Termodinamička ispitivanja izotermalnom titracionom kalorimetrijom	16
5. OSOBINE ARSENA	20
5.1. Vezivanje arsena huminskim kiselinama	23
6. OPREMA ZA ISPITIVANJE	28
6.1. Monitor termalne aktivnosti (TAM)	28
6.1.1. Opis i postupak rada monitora termalne aktivnosti	29
6.1.2. Opis i postupak rada titracione ćelije	36
6.2. Automatski titrator	38
6.3. Uređaj za određivanje veličine čestica i zeta potencijala	41
7. MATERIJALI I METODE	42
7.1. Izbor i opis huminskih kiselina	42
7.2. Priprema uzoraka huminskih kiselina za analizu	45
7.3. Priprema rastvora $As^{3+}$	45
7.4. Merenje toplote interakcije izotermalnom titracionom kalorimetrijom	45
7.5. Teorijski model i termodinamička analiza	46
7.6. Merenje zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica	48
8. REZULTATI I DISKUSIJA	49
8.1. Zeta potencijal rastvora $As^{3+}$ i zeta potencijal i srednji dinamički prečnik huminskih kiselina u zavisnosti od pH vrednosti	49
8.2. Termodinamika interakcija arsenita i huminskih kiselina	59
8.3. Zeta potencijal i srednji dinamički prečnik čestica kompleksa $As^{3+}$ - HA	61
8.4. Uticaj interakcije arsenita i huminskih kiselina na životnu sredinu	61

9. ZAKLJUČAK	63
LITERATURA	65
PRILOZI	71
Prilog 1: Excel tabela proračuna za primenu MNIS modela (TCHA)	71
Prilog 2: Excel tabela proračuna za primenu MNIS modela (LPHA)	72
Prilog 3: Excel tabela proračuna za primenu MNIS modela (ESHA)	73
Biografija autora	74
Izjava o autorstvu	75
Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada	76
Izjava o korišćenju	77

## 1. UVOD

Predmet ove disertacije je istraživanje prirode interakcije arsenita, kao najtoksičnije hemijske vrste arsena, i huminskih kiselina kao najreaktivnijih komponenti humusnih supstanci u zemljištu. Da bi se što potpunije opisalo vezivanje arsenita i huminskih kiselina, korišćene su tri eksperimentalne metode:

1. Metoda određivanja termodinamičkih parametara tehnikom izotermalne titracione kalorimetrije (ITC-Isothermal Titration Calorimetry);
2. Metoda određivanja zeta potencijala tehnikom laser Doppler elektroforeze (LDE-Laser Doppler Electrophoresis) i
3. Metoda određivanja srednjeg hidrodinamičkog prečnika čestice tehnikom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS-Dynamic Light Scattering).

Kombinacijom ove tri metode, pored termodinamičkih parametara, stiče se saznanje o stehiometriji i dominantnoj vrsti vezivanja, kao i o uticaju nastalog kompleksa na proces agregacije.

Humusne supstance su široko rasprostranjena organska jedinjenja prisutna u vodi, zemljištu i sedimentima. Zemljišne humusne supstance čine hemijski heterogenu smešu žuto do crno obojenih organskih jedinjenja, relativno velikih molekulskih masa i mešovite alifatične i aromatične prirode. Humusne supstance nastaju u reakcijama tzv. sekundarne sinteze, humifikacije, kao proizvodi mikrobiološkog i hemijskog raspadanja i transformacije ostataka živih i uginulih organizama (*Đorđević i Radmanović, 2016*). Osobine ovih prirodnih materijala direktno zavise od vrste raspadnutih tkiva biljaka i životinja od kojih su nastali, pojedinačnih produkata njihove razgradnje i zemljišne biomase.

Humusne supstance imaju značajnu ekološku funkciju, u koju spada i kontrola ponašanja zagađivača u životnoj sredini i biogeochemija organskog ugljenika u globalnom ekosistemu (*Piccolo, 2002*). Humusne supstance utiču na osobine zemljišta i vode učesćem u različitim dinamičkim procesima u kojima njihovi sastavni molekuli reaguju sa drugim molekulima ili jonima (kompleksiranje/dekompleksiranje), sa čvrstim površinama (adsorpcija/desorpcija), i međusobno (agregacija/deagregacija) (*Avena i Vilkinson, 2002*). Raznolikost i obim ovih reakcija i procesa ukazuju na visoko reaktivnu prirodu humusnih supstanci (*McCarthy, 2001*). Da bi predvideli njihovu ulogu u životnoj sredini i razumeli fizičko-hemijske reakcije u kojima učestvuju, karakterizacija veličine, oblika, konformacije, strukture i sastava humusnih supstanci je neophodna. Usled heterogenosti humusnih supstanci njihova karakterizacija je zahtevan zadatak, kako u pogledu strukture i veličine, tako i njihove sklonosti da agregiraju u rastvorima sa povećanjem koncentracije (*Jones i Brian, 1998*).

Procena strukture humusnih supstanci zasniva se na konceptima koji uzimaju u obzir njihov heterogeni sastav i polidisperznost. Zbog toga se o strukturi humusnih supstanci može diskutovati sa različitim aspektata, uključujući molekulsku konformaciju i agregaciju, makromolekularnost i supramolekularne karakteristike (*Schaumann i Thiele-Bruhn, 2011*). Tradicionalni pristup, koji se bazira na konceptu makromolekularnosti, definiše humusne supstance kao konformacije dugih lanaca molekula u obliku kalema, koji mogu biti i delimično ukršteni (*Koopal i sar., 2001*). Drugi pristup definiše humusne supstance kao asocijacije relativno malih molekula vezanih slabim interakcijama kao što su hidrofobne i vodonične veze (*Piccolo, 2002*).

Na osnovu rastvorljivosti u vodenim rastvorima pri različitim pH vrednostima, humusne supstance se dele na tri grupe: a) huminske kiseline, koje su rastvorne u razblaženim alkalnim rastvorima i talože se pri pH 2, b) fulvo kiseline, koje su rastvorne na svim pH vrednostima, čak ispod pH 2, i c) humini, koji su nerastvorni na svim pH vrednostima (*Đorđević i Radmanović, 2016*).

Huminske i fulvo kiseline se ne mogu smatrati hemijskim jedinjenjima definisanim jedinstvenom molekulskom formulom. Ova jedinjenja se opisuju strukturnim modelima formiranim na osnovu dostupnih podataka o njihovom sastavu, strukturi, reaktivnosti i osobinama. Ove kompleksne strukture sadrže iste osnovne strukturne jedinice i iste vrste reaktivnih funkcionalnih grupa koje su karakteristične za pojedinačne organske molekule (*Đorđević i Radmanović, 2016*). Ovi makromolekuli na svojoj površini nose alifatične, lipidne i lance ugljenih hidrata i aminokiseline, kao i različite hemijski reaktivne funkcionalne grupe, koje polimernim huminskim kiselinama daju kiseli karakter. Struktura i sastav fulvo kiselina su jednostavniji u odnosu na huminske kiseline, generalno imaju manju molekulsku masu, ali veću rastvorljivost i sadržaj funkcionalnih grupa koje sadrže kiseonik, kao i izraženiji alifatični karakter.

Huminske kiseline (HA), kao i ostale frakcije humusnih supstanci, imaju veliki broj reaktivnih grupa i izražen koloidni karakter, što dovodi do procesa njihove agregacije. U vodenim suspenzijama, u zavisnosti od različitih uslova životne sredine (pH, jonska jačina, koncentracija, starenje, vrsta i koncentracija prisutnih organskih i neorganskih jona, prisustvo čvrstih čestica), polidisperzne huminske kiseline spontano menjaju svoja konformaciona i agregaciona stanja. Pored toga, procesi agregacije zavise i od porekla i procedure pripreme huminskih kiselina (*Tombácz, 1999*).

Transport zagađivača usled dinamike podzemnih i površinskih voda je važan faktor u proceni rizika od kontaminacije. Zagađivači koji se čvrsto vezuju za mobilnu prirodnu organsku materiju transportuju se brže kroz životnu sredinu i ovaj fenomen je poznat kao koloidima potpomognut transport. Takođe, mobilnost rastvornih huminskih supstanci je povezana sa njihovom interakcijom sa zemljišnim mineralnim česticama (*Koopal i sar., 2001*). Zagađivači u zemljištu, vezani za nerastvornu organsku materiju ili za rastvornu organsku materiju sorbovanu na zemljišnim mineralnim česticama, mogu se smatrati slabo pokretnim. Značajna uloga humusnih supstanci u proceni rizika od kontaminacije životne sredine organskim i neorganskim zagađujućim supstancama predmet je mnogobrojnih istraživanja.

Kako su već pomenute značajne razlike u sastavu i strukturi huminskih kiselina zavisno od ekosistema u kom su nastale, veoma je korisno ispitati procese vezivanja jona teških metala i drugih polutanata za konkretne huminske kiseline, poreklom iz zemljišta sa teritorije Srbije. Određivanjem termodinamičkih veličina posmatranog procesa dobijaju se podaci koji ukazuju na to u kojoj meri je određen proces spontan, reverzibilan, egzoterman ili endoterman, kao i na uticaj raznih parametara sredine na njegov tok. Dobijene rezultate je moguće koristiti pri optimizaciji mera rekultivacije ili oplemenjivanja zemljišta.

Arsen je izrazito toksičan metaloid vrlo zastupljen u životnoj sredini. U visokim koncentracijama nalazi se naročito u eksploatacionim jalovištima, odakle se, nošen vetrovima i vodotokovima, lako rasprostire, zbog čega je od izuzetnog značaja dobro poznavanje dinamike njegovog transporta kroz životnu sredinu. Od posebnog značaja su ispitivanja interakcije arsena i huminskih kiselina kao najreaktivnijih komponenti zemljišne organske supstance. Ovakva ispitivanja su izuzetno važna za okolinu Bora, u kojoj arsen, prisutan u visokim koncentracijama

u vazduhu, vodi i zemljištu, predstavlja jedan od najvećih ekoloških problema (*Lilić i sar., 2014*).

Gornji sloj dela jalovišta („Polje 2“) nastalog flotacijom bakra u okviru Serbia Zijin Bor Copper doo Bor rekultivisan je 1991. godine nanošenjem obradivog zemljišta i revegetacijom. Prethodna istraživanja (*Lilić i sar., 2014*), su pokazala da se u procesu rekultivacije formirao sloj tehnosola koji se odlikuje degradiranom strukturom, niskim sadržajem humusa, dominantno kiselom reakcijom, slabom aktivnošću zemljišnih mikroorganizama i visokim koncentracijama arsena i bakra. Sa stanovišta zaštite životne sredine, od posebne važnosti je ispitivanje procesa vezivanja izuzetno toksičnog arsena huminskim kiselinama izolovanim iz formiranog tehnosola.

Kako bi se dobila što potpunija slika o prirodi vezivanja arsenita i huminskih kiselina iz zemljišta, cilj ove disertacije je detaljno ispitivanje ovog procesa primenom navedenih metoda. Dobijeni rezultati i njihova tumačenja daju značajan doprinos optimizaciji procesa remedijacije zemljišta kontaminiranih arsenom, što je, pored mnogobrojnih drugih lokacija, važan i akutni problem okoline Bora.

## 2. OSOBINE HUMINSKIH KISELINA

Huminske kiseline predstavljaju frakciju humusnih supstanci, koje se smatraju glavnim komponentama prirodne organske materije u zemljištu i vodi, kao i u geološkim organskim depozitima, kao što su jezerski sedimenti, treset, mrki ugalj i škriljci. U vodenim sistemima, kao što su reke, oko 50% rastvorenih organskih materija su humusne supstance koje utiču na njihov pH i puferski kapacitet. U kopnenim i vodenim sistemima humusne supstance utiču na hemijske procese, biološki ciklus hemijskih elemenata, kao i transport i degradaciju antropogenih i prirodnih organskih supstanci. One utiču na biološku produktivnost u vodenim ekosistemima, kao i na formiranje štetnih proizvoda pri dezinfekciji vode (*Mahler i sar., 2021*). Humusne supstance u najvećem delu doprinose smeđoj do crnoj boji površinskog sloja zemljišta.

Kao što je već rečeno, humusne supstance se mogu podeliti u tri glavne grupe: huminske kiseline, fulvo kiseline, njihovih soli (humati i fulvati) i humini (tabela 1). Huminske i fulvo kiseline se ekstrahuju iz zemljišta i drugih izvora korišćenjem jakih baza (NaOH ili KOH). Huminske kiseline su nerastvorne na niskom pH, i one se talože dodavanjem jake kiseline (npr. podešavanje do pH 1 sa HCl). Tretiranjem zemljišta baznim rastvorima, humini ostaju vezani sa mineralnim delom.

Tabela 1. Podela humusnih supstanci zemljišta (*Đorđević i Radmanović, 2016*)

HUMUSNE SUPSTANCE ZEMLJIŠTA			
<b>HUMUSNE KISELINE</b> <i>Deo koji se ekstrahuje razblaženim rastvorima jakih baza</i>		<b>HUMATI I FULVATI</b> <i>Soli huminskih i Fulvo kiselina</i>	<b>HUMINI</b> <i>Deo koji se ne ekstrahuje razblaženim rastvorima jakih baza i kiselina</i>
<b>HUMINSKE KISELINE</b> <i>Deo koji se taloži rastvorima jakih kiselina</i>	<b>FULVO KISELINE</b> <i>Deo koji se ne taloži rastvorima jakih kiselina</i>		
Huminska	<b>Krenska</b> <b>Svetlo žuta</b> <b>Apokrenska</b> <b>Žuto smeđa</b>		
Ulminska			
Himetamenalova <i>Sve su tamne boje, od smeđe do crne</i>			

Vodene humusne supstance sadrže samo huminske i fulvo kiseline, koje se generalno uklanjaju iz vode snižavanjem  $\text{pH} \leq 2$  i apsorbovanjem obe komponente odgovarajućom jonoizmenjivačkom smolom. Huminske i fulvo kiseline se ekstrahuju iz smole jakom bazom, a potom se snižava  $\text{pH} \leq 1$  i taloži se huminska kiselina. Razdvajanje na koloni smolom se takođe koristi za odvajanje fulvokiselina od nehuminskih materija (aminokiseline, peptidi, šećeri, itd.) ekstrahovanih iz zemljišta. Pri niskom pH fulvo kiseline se adsorbuju na smoli, a nehumusne materije prolaze kroz kolonu. Humusne supstance su visoko hemijski reaktivne iako su relativno

otporne na biodegradaciju. Većina podataka o huminskim i fulvo kiselinama, kao i huminima, odnose se na prosečne osobine i strukturu velike grupacije komponenti različitih struktura i molekulskih masa. Prosečne osobine i struktura datog uzorka humusnih supstanci zavise od porekla zemljišta ili vode, kao i od specifičnih uslova sredine. Ipak, prosečna svojstva humina, huminskih i fulvo kiselina su generalno slična (*Davies i Ghabbour, 2001*).

Zemljišne humusne supstance prvenstveno nastaju degradacijom ostataka biljaka, životinja i mikroorganizama. U vodenim sistemima, humusne supstance potiču iz zemljišnih slivova ili nastaju na licu mesta humifikacijom organskih jedinjenja nastalih transformacijom algi, podvodnih biljaka, životinja i mikroorganizama.

Humusne supstance imaju značajnu ulogu u vezivanju organskih (*Chiou i sar., 1979; Murphy i sar., 1994; Koopal i sar., 2001*) i neorganskih (*Koopal i sar., 2001*) zagađujućih supstanci u životnoj sredini. Ove interakcije imaju veliki uticaj kako na slobodnu, tako i na ukupnu koncentraciju zagađivača u zemljišnom rastvoru, površinskim i podzemnim vodama (*Koopal i sar., 2001*). Koncentracija nevezanih, slobodnih zagađivača je od suštinskog značaja za dostupnost biljkama, kao i za njihovu toksičnost. Rastvorljivost i pokretljivost ovih štetnih materija u prirodnim vodama mogu biti redukovane vezivanjem za humusne supstance zemljišta, ili povećane vezivanjem za rastvorene humusne supstance. Na primer, hidrofobni pesticidi, kao što su atrazin ili teflutrin, mogu biti zarobljeni u hidrofobnim šupljinama humusnih supstanci (*Koopal i sar., 2001*). Kako su zemljišne humusne supstance generalno hidrofobnije nego one poreklom iz voda, hidrofobne zagađujuće materije se akumuliraju u zemljištu (*Murphy i sar., 1994*), što dovodi do smanjenja njihove rastvorljivosti.

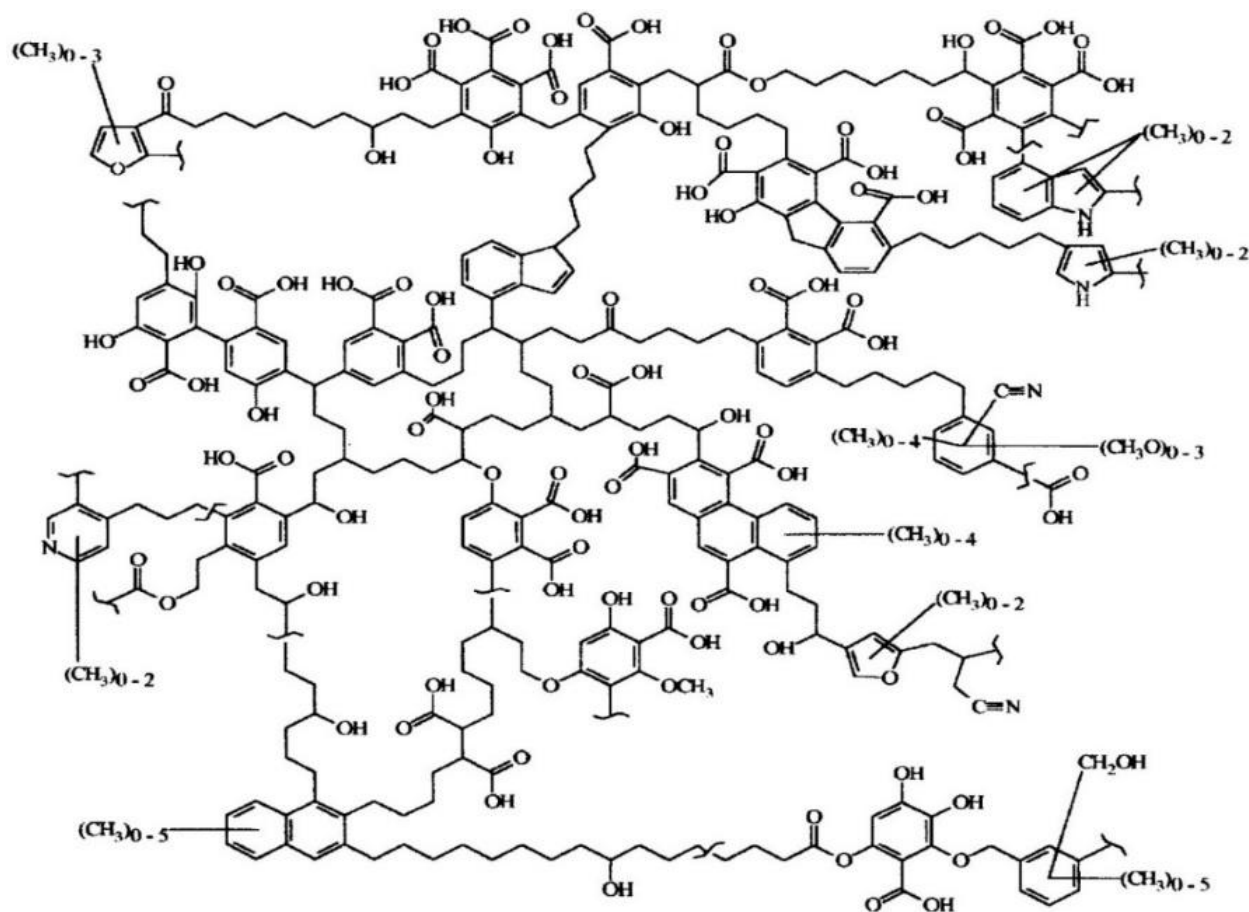
Značajne količine antropogenih organskih zagađivača (AOZ) mogu dospeti u zemljište sa određenom namerom, kao što je npr. primena pesticida u poljoprivrednoj proizvodnji, ili nenamerno, kada AOZ u zemljište dolaze iz čvrstog i tečnog industrijskog i komunalnog otpada, kao i mokrom ili suvom atmosferskom depozicijom koja potiče od otpadnih hemikalija ili spaljivanja čvrstog otpada. Čvrst i tečni komunalni otpad se često koristi i kao dodatak zemljištima, čime se poboljšavaju njihove osobine, ali istovremeno dolazi do zagađenja tako tretiranog zemljišta.

*Senesi (1992) i Chianese i sar. (2020)* su objavili rezultate detaljnih proučavanja procesa adsorpcije i desorpcije AOZ na humusnim supstancama, koja uključuju kvantitativno merenje izoterma adsorpcije/desorpcije i koeficijenta raspodele, kao i kvalitativno objašnjenje mehanizama ovih interakcija. Adsorpcija je verovatno najvažniji oblik interakcije zagađujućih supstanci sa komponentama zemljišta, a naročito sa humusnim supstancama. AOZ se mogu adsorbovati na humusnim supstancama specifičnim fizičkim i hemijskim mehanizmima vezivanja realizovanih silama različitih vrsta i jačina. Ove interakcije uključuju vezivanje jonskim, kovalentnim i vodoničnim vezama, mehanizme transfera naelektrisanja (elektron donorsko-akceptorski mehanizmi), interakcije dipol-dipol, Van der Waals-ove sile, razmenu liganada i stvaranje mostova katjonima i molekulima vode. Ipak, adsorpcija nepolarnih (hidrofobnih) AOZ može se bolje objasniti nespecifičnim, hidrofobnim procesima ili procesima njihove raspodele između humusnih supstanci čvrste i tečne faze zemljišta.

Huminske kiseline, kao frakcija humusnih supstanci, su kompleksne i raznovrsne mešavine polidisperznih materijala formiranih složenim biohemijskim i hemijskim reakcijama organskih jedinjenja nastalih tokom raspadanja i transformacije ostataka biljaka, životinja i mikroorganizama, i taj proces se naziva humifikacija. Biljni lignin i proizvodi njegove transformacije, kao i polisaharidi, melanin, kutin, proteini, lipidi, nukleinske kiseline, fine čestice čađi, itd., važne su komponente koje učestvuju u ovom procesu. Huminske kiseline su veoma

važne komponente zemljišta koje utiču na fizičke i hemijske osobine, kao i plodnost zemljišta (Piccolo, 2002).

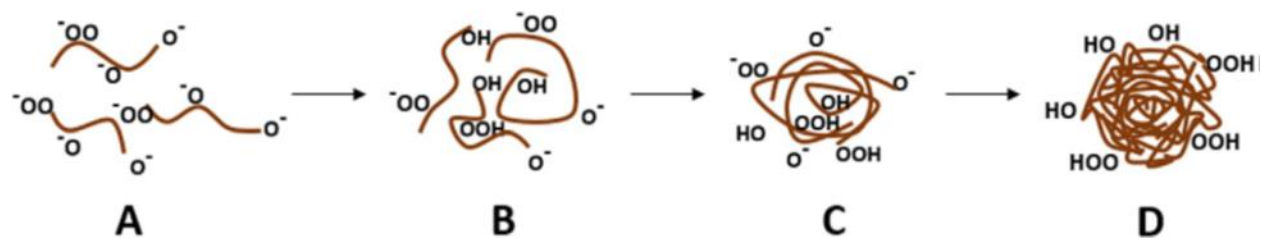
Huminske kiseline se smatraju prirodnim organskim polielektrolitima kompleksne strukture, koja uključuje više ili manje kondenzovanih aromatičnih prstenova sa velikim brojem vezanih -OH i -COOH grupa. One su organski ligandi i igraju ključnu ulogu u formiranju, transportu i taloženju raznih jedinjenja u rasponu od jona metala do lipofilnih jedinjenja (Livens, 1991). Jedna od predloženih strukturalnih formula huminske kiseline prikazana je na slici 1.



Slika 1. Jedna od predloženih strukturalnih formula huminskih kiselina (Jones i Bryan, 1998).

U zavisnosti od pH vrednosti sredine, huminske kiseline imaju različit stepen agregacije, od potpuno zasebnih osnovnih molekula, pri visokim pH vrednostima, do potpune agregacije i stvaranja makroskopskih agregata (de Melo i sar., 2016). Ovaj proces je ilustrovan na slici 2.



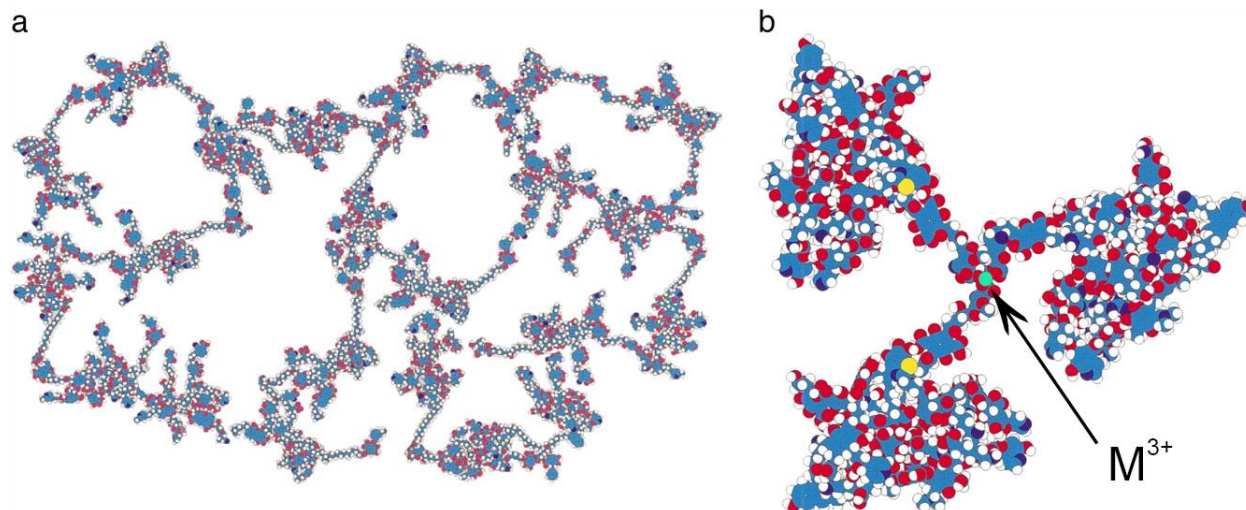


Slika 2. Ponašanje molekula huminske kiseline u alkalnoj sredini i proces agregacije nakon redukcije pH vrednosti. Alkalni pH: osnovni zasebni molekuli (A). Smanjenje pH vrednosti: unutamolekularna agregacija (B). Dalje smanjenje pH vrednosti: međumolekularna agregacija (C). Kiseli pH: taloženje (D). (de Melo i sar., 2016)

Pri visokim pH vrednostima dolazi do disocijacije vodonika sa funkcionalnih grupa, tako da se molekuli huminskih kiselina međusobno odbijaju usled prisutnog negativnog naelektrisanja na funkcionalnim grupama. Smanjenjem pH vrednosti dolazi do delimičnog vezivanja vodonika za funkcionalne grupe, tako da se uspostavljaju vodonične veze unutar samih molekula, pri čemu dolazi do intramolekularne agregacije. Daljim smanjenjem pH vrednosti pomenuti proces se nastavlja tako da dolazi do povezivanja među molekulima, to jest do intermolekularne agregacije. Smanjenjem pH vrednosti do kisele sredine dolazi do taloženja formiranih agregata.

Huminske kiseline, kao polidisperzni polielektroliti, poseduju veliki broj hidrofilnih i hidrofobnih reakcionih mesta, značajnu površinsku aktivnost i relativno otvorenu, fleksibilnu, sunderastu strukturu sa velikim brojem šupljina (Koopal i sar., 2001). Sve gore opisane osobine humusnih supstanci, a naročito huminskih kiselina, definišu ih kao organske komponente dominantne u interakciji sa različitim jedinjenjima.

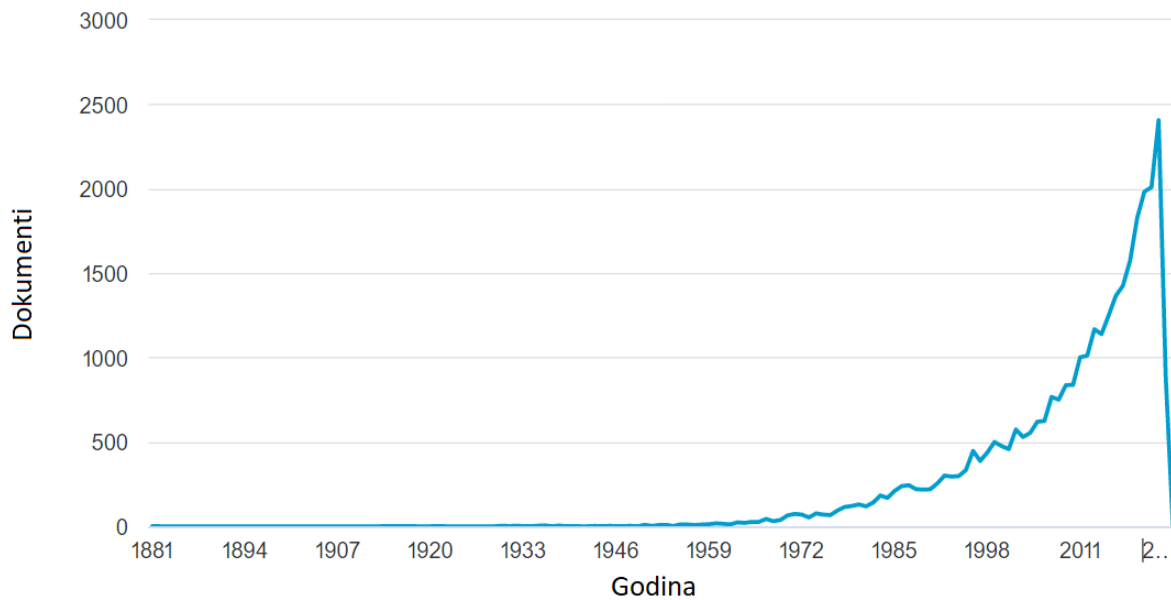
Huminske kiseline, kao heterogeni makromolekuli sa velikim brojem reaktivnih površinskih grupa, pri određenim uslovima sredine podležu procesu agregacije (slika 3a), pri čemu se formiraju nanočestice različitih veličina, sve do onih koje prevazilaze nano opseg (Baalousha, 2009; Jovanović i sar., 2013). Utvrđeno je da huminske kiseline grade komplekse sa jonima metala (slika 3b) i tako utiču na njihov transport kroz slojeve zemljišta, kontrolišući njihovo usvajanje od strane biljaka preko korenovog sistema. Ova sposobnost huminskih kiselina, kao i ostalih humusnih supstanci, da formiraju stabilne komplekse sa različitim metalima ima i važne posledice u mineralnoj ishrani biljaka na zemljištima gde ovi metali grade nerastvorne soli u vodi, pa prema tome nisu lako dostupni biljkama (Fuentez i sar., 2013).



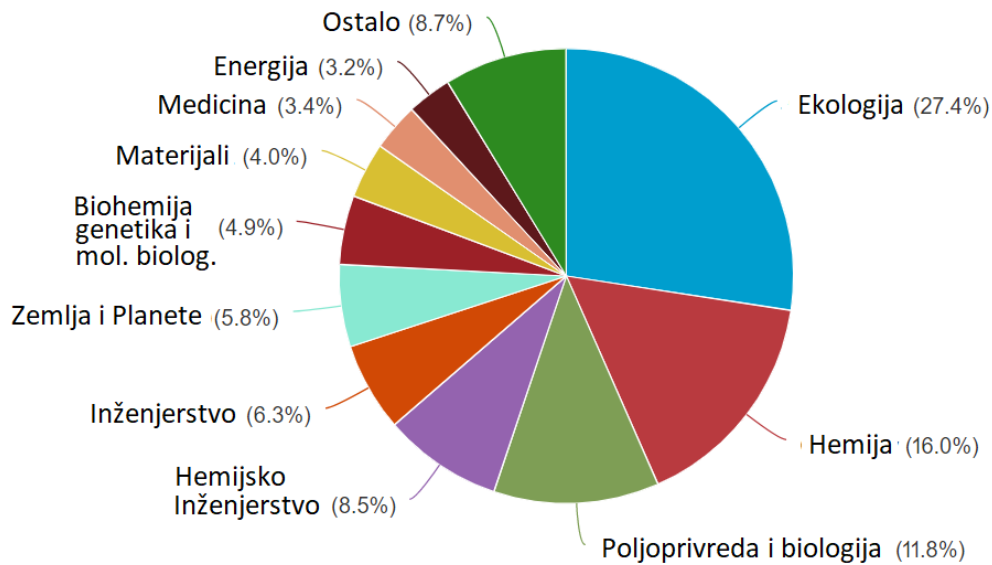
Slika 3. a) Samoagregacija molekula huminske kiseline; b) Vezivanje jona metala i tri agregata huminske kiseline i formiranje složenog kompleksa (metalni jon je označen zelenom bojom) (Schaumann i Thiele-Bruhn, 2011)

Adsorpcija/desorpcija AOZ zemljišnim huminskim kiselinama se smatra jednim od najvažnijih procesa koji kontrolišu osobine i sudbinu organskih zagađivača u zemljištu, uključujući njihovu mobilnost, transport, akumulaciju, dostupnost i toksičnost, pa samim tim i monitoring ostataka AOZ u zemljištu, kao i procenu potencijalno štetnog uticaja na životnu sredinu.

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnoj reči "humic acids" dalo je 32.542 dokumenta. Evidentirani rezultati proučavanja huminskih kiselina datiraju od kraja devetnaestog veka, dok je izraziti porast nastupio početkom 60-ih godina prošlog veka, što je prikazano na slici 4a. Procentualna raspodela po oblastima istraživanja data je na slici 4b. U najvećem broju zastupljeni su radovi iz oblasti ekologije, hemije, poljoprivrede i biologije, dok je zastupljenost u ostalim oblastima ispod 10%.



Slika 4a. Broj objavljenih radova po godinama za ključnu reč pretraživanja „humic acids” u periodu od 1881–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

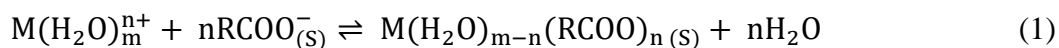


Slika 4b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja za ključnu reč „humic acids” u periodu od 1881–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

### 3. VEZIVANJE JONA METALA HUMINSKIM KISELINAMA

Humusne supstance snažno intereaguju sa katjonima, što utiče na njihovu rasprostranjenost u životnoj sredini. To je posebno važno i iz razloga što se osobine slobodnih metalnih jona razlikuju od osobina organometalnih jedinjenja. Vezivanje metalnih jona za huminske i fulvo kiseline je važno za transport jona metala u životnoj sredini, jer dovodi do povećanja njihove pokretljivosti. Prisustvo huminskih kiselina povećava rastvorljivost toksičnih metala kao što su olovo, bakar i cink, što takođe smanjuje sorpciju ovih metala na česticama gline. Kada je u pitanju vezivanje toksičnih metala huminskim kiselinama, bitno je prisustvo njihovih slobodnih katjona, a ne ukupni sadržaj metala. U nekim slučajevima, prisustvo huminskih kiselina povećava ukupnu toksičnost sistema sprečavajući taloženje metala i tako ih zadržavajući u sistemu. Takođe, huminske kiseline mogu i da povećaju biološku dostupnost metala biljkama, kao što je slučaj sa npr. kadmijumom (*Jones i Bryan, 1998*).

Do sad je predloženo više modela vezivanja metalnih jona i huminskih kiselina. Kod najčešće korišćenog modela, vezivanje hidratisanog metalnog jona za karboksilnu funkcionalnu grupu huminske kiseline pretstavlja se sledećom jednačinom (*Ghabbour i sar, 2006A*):



Dosadašnji rezultati ukazuju na različite oblike kompleksiranja u zavisnosti od posmatranog metala, kao i od tipa i porekla huminske kiseline. Na slici 3a prikazan je model međusobnog vezivanja molekula huminskih kiselina i nastajanja agregata (samoagregacija), a na slici 3b model vezivanja agregata huminskih kiselina i trovalentnog jona metala, pri čemu nastaje složen kompleks.

Huminske kiseline vezuju sve prelazne metale, uključujući, alkalne i zemnoalkalne metale, lantanoide i aktinoide, s tim što jačina ovih veza zavisi od hemijskih osobina pojedinačnog metala. Vezivanje metalnih jona za huminske kiseline pokazuje značajnu zavisnost od jonske jačine i pH. Prema metalima huminske kiseline se ponašaju kao oksido-redukciona sredstva, pa se tako, npr., vezivanjem za huminsku kiselinu gvožđe redukuje od feri- do ferojona, kao i u slučaju aktinoida, neptunijuma i plutonijuma (*Jones i Bryan, 1998*).

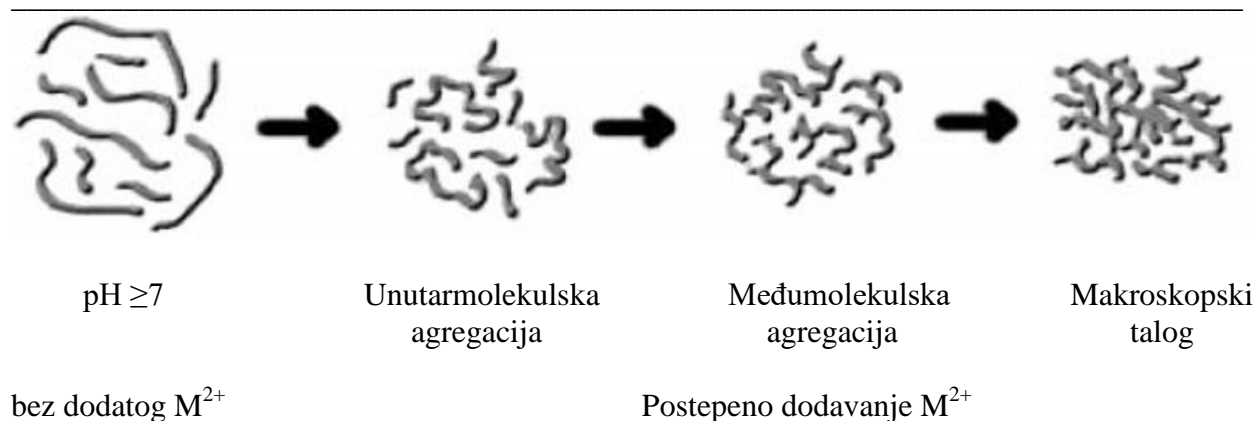
Sa aspekta zaštite od radioaktivnih jedinjenja, interesantni su rezultati istraživanja vezivanja aktinoida za humusne supstance, koji pokazuju da su konstante stabilnosti kompleksa ovih metalnih jona sa humusnim supstancama značajno veće od konstanti stabilnosti kompleksa sa neorganskim jedinjenjima dostupnim u životnoj sredini u koju se radioaktivni otpad odlaže. Na taj način, humusne materije bi mogle reagovati sa plutonijumom i drugim aktinoidima povećavajući njihovu pokretljivost, koja bi inače ostala mala zahvaljujući slaboj rastvorljivosti njihovih neorganskih jedinjenja. Ispitivanja vršena radi poređenja ukupne radioaktivnosti u zemljištu kontaminiranom americijumom i plutonijumom pokazuju da je specifična aktivnost huminske kiseline bila oko deset puta veća od specifične aktivnosti ukupnog uzorka zemljišta (*Jones i Bryan, 1998*).

Kompleksiranje metalnih jona huminskim kiselinama je izuzetno važno za uticaj zadržavanja i pokretljivosti metalnih zagađivača u zemljištu i vodama. *Arnold (1998)* je proučavao vezivanje tri organokalajna jedinjenja sa rastvorenim huminskim kiselinama i utvrdio da je reakcija regulisana kompleksiranjem odgovarajućeg triorganokalajnog katjona negativno naelektrisanim ligandima huminskih kiselina, odnosno karboksilnim i fenolnim grupama.

Konstante stabilnosti helata su različite za različite huminske kiseline i jone metala. *Misra i sar. (1996)* i *Pandey i sar. (1999)* su proučavali ulogu huminskih kiselina u vezivanju metala formiranjem rastvorljivih kompleksa, a *Pandey i sar. (2000)* su odredili i uporedili konstante stabilnosti kompleksa huminskih kiselina izolovanih iz zemljišta i određenih jona metala kako bi utvrdili afinitet metala prema organskim ligandima, a samim i tim ponašanje teških metala u životnoj sredini. Vrednosti konstante stabilnosti ( $\log K$ ) za različite komplekse metal - huminska kiselina imale su sledeći redosled:  $\text{Cu} > \text{Fe} > \text{Pb} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Ca} > \text{Cd} > \text{Zn} > \text{Mn} > \text{Mg}$ . Kapacitet izmene humusnog rastvora, molekularni prečnik i molekularna površina huminskih molekula su faktori koji utiču na konstante stabilnosti. Značaj ovih podataka ogleda se u mogućnosti da se predvidi ponašanje ovih kompleksa u životnoj sredini.

*Tipping (1998)* je uspostavio model koji pokušava da reši pitanje kompeticije u jonskoj izmeni proton - metal i metal - metal u molekulima huminskih kiselina. Ovaj model pokazuje značajnu kompleksnost i sadrži veliki broj parametara, što ukazuje na složenost sistema. Ova složenost je posledica izražene heterogenosti i promenljive stehiometrije reakcija vezivanja, kao i prisustva elektrostatičkih interakcija. Takođe, kao veoma uspešan pokazao se i model neidealne kompetitivne adsorpcije (NICA-Non-Ideal Competitive Adsorption) (*Xu i sar., 2018*).

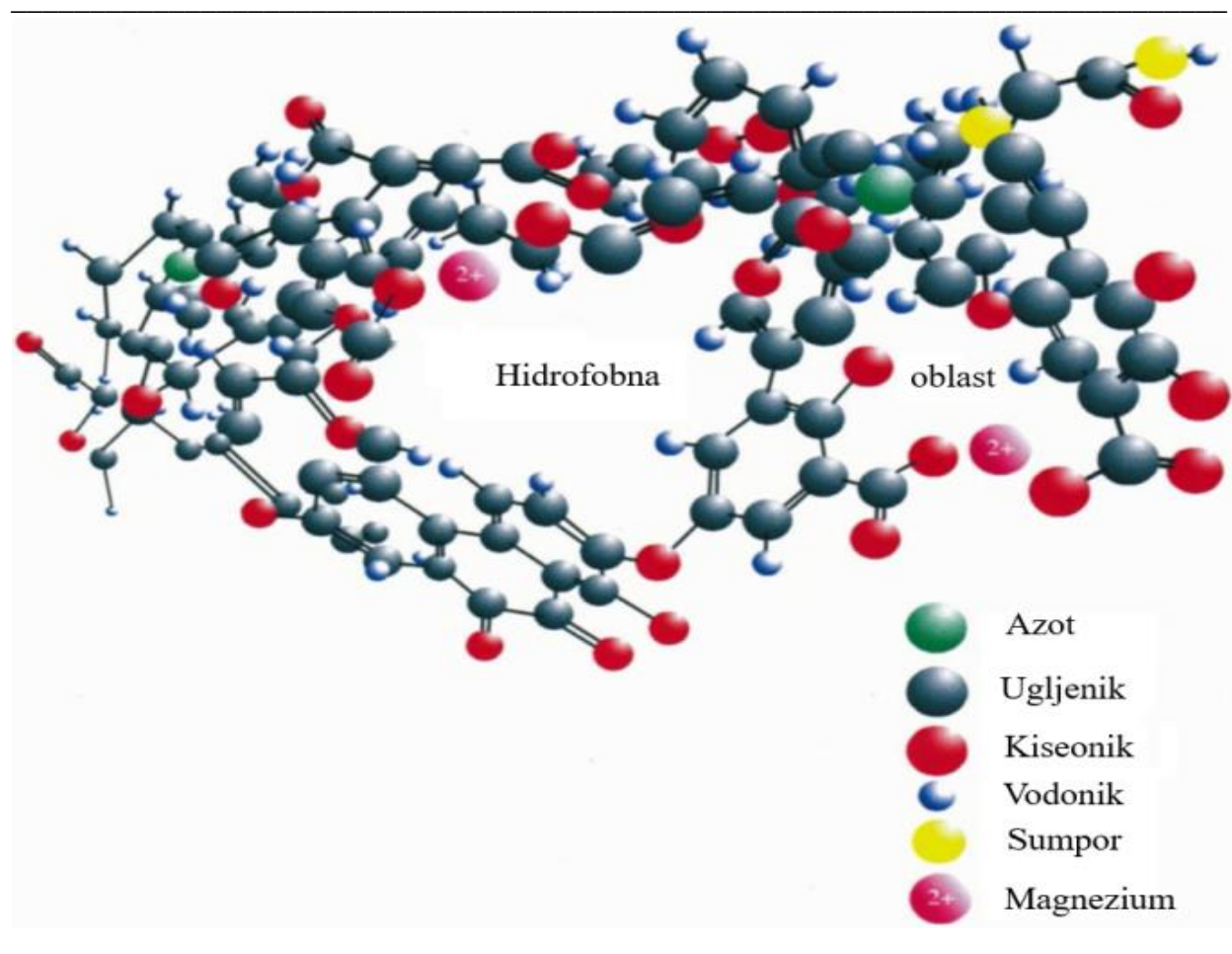
U svom radu *von Wandruszka (2000)* ukazuje na amfifilne (hidrofilne i lipofilne) osobine metalnih kompleksa huminskih kiselina. Zapaženo je da huminske kiseline u rastvoru stvaraju flokule povećavanjem jonske jačine, što ukazuje na mogućnost da se agregacija huminskih polimera odvija kontinuirano od stvaranja micela do makroskopskih taložnih veličina sa povećanjem koncentracije jona metala (slika 5).



Slika 5. Prikaz agregacije huminskih kiselina sa dodavanjem dvovalentnog jona metala  $M^{2+}$  (von Wandruszka, 2000)

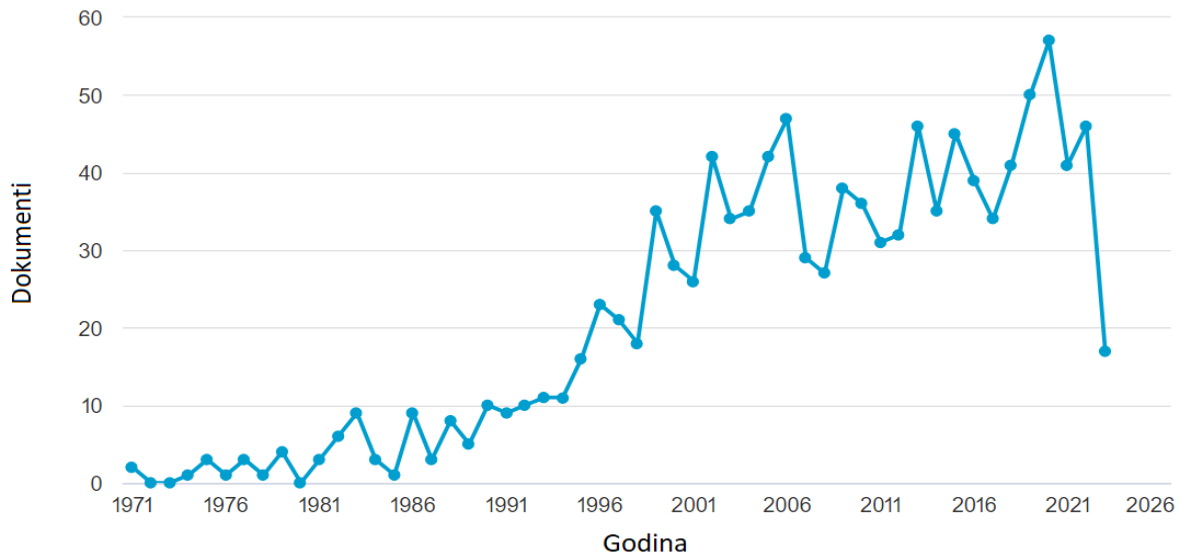
Rezultati pokazuju da vodene huminske kiseline postaju efikasnije površinski aktivne materije u prisustvu soli, što je u potpunosti definisano prirodom katjona. Takođe je utvrđeno da se ove osobine huminskih kiselina u rastvoru poboljšavaju sa povećanjem sadržaja metalnih jona usled kombinacije neutralizacije naelektrisanja huminske kiseline i premošćavanja funkcionalnih grupa viševalentnim katjonima, pri čemu se formiraju pseudomicelle. Rastvoreni molekuli

huminskih kiselina nose značajno negativno naelektrisanje koje sprečava unutar molekularno i međumolekularno povezivanje. Međutim, prisustvo viševalentnih katjona u rastvoru neutrališe negativno naelektrisanje, omogućavajući grupisanje i savijanje polimera. Pored toga, viševalentni katjoni povećavaju efekat premošćavanja karboksilnih i hidroksilnih grupa na susjednim lancima (slika 6), što dovodi do stvaranja ili povećavanja pseudomicela huminskih kiselina, kao i izraženijeg amfifilnog efekta.

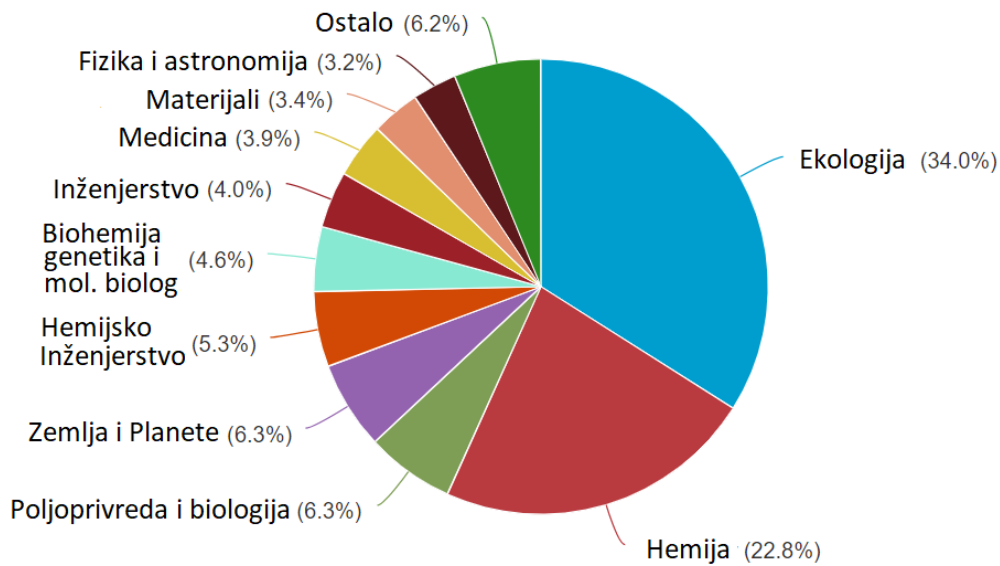


Slika 6. Predpostavljena struktura kompleksa huminske kiseline i jona metala (von Wandruszka, 2000)

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnim rečima "humic acids&metals&binding" dalo je 1.124 dokumenta. Grafički prikaz ovih rezultata dobijenih po godinama dat je na slici 7a, a procentualna raspodela po oblastima istraživanja data je na slici 7b. Najzastupljeniji su dokumenti iz oblasti ekologije, nešto manje iz oblasti hemije, dok zastupljenost u ostalim oblastima iznosi nekoliko procenata.



Slika 7a. Broj objavljenih radova po godinama za ključnu reč pretraživanja „humic acids&metals&binding” u periodu od 1971–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))



Slika 7b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja za ključne reči „humic acids&metals&binding” u periodu od 1971–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

#### 4. TERMODINAMIČKA ISPITIVANJA VEZIVANJA JONA METALA HUMINSKIM KISELINAMA

Za poznavanje bilo kog konkretnog procesa i utvrđivanje stepena njegove spontanosti, reverzibilnosti i stabilnosti produkata, kao i merenja toplotnih efekata (egzoterman ili endoterman proces), neophodno je izvršiti eksperimentalno određivanje termodinamičkih veličina ( $K$  - konstanta reakcije,  $\Delta H$  - promena entalpije,  $\Delta G$  - promena Gibbs-ove slobodne energije i  $\Delta S$  - promena entropije) vezanih za odvijanje procesa. Postoje dva osnovna pristupa određivanju termodinamičkih osobina procesa. Prvi uključuje ispitivanje ravnotežnih stanja, odnosno određivanje ravnotežnih izotermi, a drugi se odnosi na merenje toplotnih promena koje se dešavaju u toku procesa (kalorimetrijska merenja).

##### 4.1. Termodinamička ispitivanja utvrđivanjem ravnotežnih izotermi

Za utvrđivanje ravnotežnih izotermi potrebno je meriti koncentracije slobodnog metalnog jona i metalnog jona vezanog za huminsku kiselinu u stanju ravnoteže pri određenoj temperaturi. Postoji više matematičkih modela izotermi (tabela 2) za predstavljanje ravnotežnih koncentracija, na osnovu čijih linearnih oblika se iz odsečka i nagiba određuju konstante ravnoteže i stehiometrijski odnosi izučavane reakcije.

Tabela 2. Ravnotežne izoterme

Izoterma	Nelinearni oblik	Linearni oblik	$K^*$	$q_m$ $n$ $b_T$
Langmuir 1	$q_e = (q_m K_L c_e) / (1 + K_L c_e)$	$c_o/q_e = (1/q_m)c_e + 1/(q_m K_L)$	B/A	1/B
Langmuir 2		$1/q_e = (1/(q_m K_L))1/c_e + 1/q_m$	A/B	1/A
Langmuir 3		$q_e = -(1/K_L) q_e/c_e + q_m$	-1/B	A
Langmuir 4		$q_e c_e = -K_L q_e + q_m K_L$	-B	-A/B
Freundlich	$q_e = K_F c_e^{1/n}$	$\ln q_e = (1/n) \ln c_e + \ln K_F$	$\exp^A$	1/B
Temkin	$q_e = (RT/b_T) \ln K_T + (RT/b_T) \ln c_e$	$q_e = (RT/b_T) \ln K_T + (RT/b_T) \ln c_e$	$\exp^{A/B}$	RT/B
Dubinina-Redushkevich	$q_e = q_m \exp(-k c_e^2)$ $e^2 = (1 + 1/c_e)^2$	$\ln q_e = \ln q_m - k \ln(1 + 1/c_e)^2$	-B	$\exp^A$
Eadie-Hoffstee	$q_e = q_m - q_e / (K_C c_e)$	$q_e = -(1/K_C) q_e / c_e + q_m$	-1/B	A

\* $K_F$ ,  $K_L$ ,  $K_C$ ,  $K_T$ ,  $k$ ,  $b_T$ ,  $n$  - konstante karakteristične za navedene izoterme;  $q_e$  - ravnotežna količina vezanog jona metala,  $q_m$  - kapacitet vezivanja;  $c_o$  i  $c_e$  - početna i ravnotežna koncentracija;  $T$  - temperatura;  $R$  - univerzalna gasna konstanta;  $A$  - odsečak;  $B$  - nagib prave.

Na osnovu jednačine za promenu Gibbs-ove slobodne energije (2):



$$\Delta G = - RT \ln K \quad (2)$$

i veze između  $\Delta G$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta S$  (3):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \quad (3)$$

dobija se linearni oblik jednačine (4):

$$\ln K = -\Delta H/RT + \Delta S/R \quad (4)$$

na osnovu koga je moguće eksperimentalno odrediti promene entalpije i entropije iz temperaturske zavisnosti konstanti ravnoteže.

U literaturi su prikazani rezultati primene metode ravnotežnih izoterma u termodinamičkim ispitivanjima procesa vezivanja različitih jona metala huminskim kiselinama.

*Ghabbour i sar. (2001)* su ispitivali vezivanje nestabilnih katjona ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Mn}^{2+}$ ) u vodenom rastvoru zemljišnih huminskih kiselina, koje se odvija u sekvencijalnim stupnjevima. Dobijene izoterme su dobro opisane Langmuir-ovim modelom. U ovom radu je izvršeno poređenje kapaciteta raspoloživih mesta u strukturi huminskih kiselina i ravnotežnih konstanti vezivanja metalnih katjona za različite aktivne centre. Merenja na različitim temperaturama dala su linearnu korelaciju između promene entalpije i entropije, ukazujući da su konformacijske promene i hidratacija/dehidratacija katjona i huminskih kiselina važni faktori u vezivanju i otpuštanju metala od strane huminskih kiselina.

*Baker i Khalili (2005)* su proučavali reakciju kompleksiranja zemljišne huminske kiseline i teških metala  $\text{Cd}^{2+}$  i  $\text{Zn}^{2+}$  na pH 4 i 5, pri konstantnoj jonskoj jačini (0,1) i na različitim temperaturama (25, 35, 45, 55 i 65 °C). Ovo ispitivanje je izvršeno korišćenjem Schubert-ove metode jonske izmene, kao i njene modifikovane verzije. Određene su konstante stabilnosti kompleksa metal-huminska kiselina i zaključeno je da su formirani kompleksi 1:1 i 1:2 tipa. Vrednosti konstanti stabilnosti za sve komplekse povećavaju se sa povećanjem pH i temperature. Konstante stabilnosti su veće za kompleks Cd - huminska kiselina nego za Zn - huminska kiselina na svim temperaturama i pH vrednostima. Na osnovu temperaturske zavisnosti konstanti stabilnosti određeni su odgovarajući termodinamički parametri ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta S$ ) i rezultati pokazuju da su kompleksi metal-huminska kiselina stabilni, a njihovo formiranje entropijski favorizovano (pozitivna vrednost  $\Delta S$ ). Reakcija stvaranja kompleksa je bila endotermna, a negativne vrednosti  $\Delta G$  ukazuju na spontanost procesa. Navedeni autori su istom metodom proučavali termodinamički aspekt i jačinu vezivanja  $\text{Cu}^{2+}$  i  $\text{Ni}^{2+}$  zemljišnim huminskim kiselinama i dobijeni su slični rezultati. Vrednosti konstanti stabilnosti su veće za kompleks Cu - huminska kiselina nego za kompleks Ni - huminska kiselina.

Vezivanje i otpuštanje metala od strane huminskih kiselina utiče na pokretljivost i bioraspoloživost metala. *Ghabbour i sar. (2006A)* su odredili izoterme za vezivanje metalnih jona  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  i huminskih kiselina u zemljištima i sedimentima na pH 2 i zaključili da se ovaj proces može opisati Langmuir-ovom izotermom. Niska pH vrednost je izabrana da se karboksilne grupe u huminskim kiselinama protonuju, ali i da se izbegne hidroliza metalnih katjona. Vezivanje metalnih katjona dešava se u jednom koraku. Kapacitet raspoloživih mesta u strukturi huminske kiseline ne zavisi od temperature u opsegu od 10-40 °C i ukazuje da se formiranje stabilnih kompleksa  $\text{M}(\text{OOC-R})_n$  ( $n=2$  za  $\text{Pb}^{2+}$  i 3 za  $\text{Fe}^{3+}$ ) vrši neutralizacijom

naelektrisanja. Afinitet vezivanja metalnih katjona i huminske kiseline ima redosled  $\text{Fe}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$ . Isti autori (*Ghabbour i sar. 2006B*) su dobili slične rezultate za vezivanje zemljišnih huminskih kiselina i katjona  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+}$  i  $\text{Hg}^{2+}$ . Vezivanje se odigrava takođe u jednom koraku, sa sledećim redosledom:  $\text{Co}(\text{NH}_3)_6^{3+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Mn}^{2+}$ .

*Ying i sar. (2008)* su proučavali termodinamičke i kinetičke osobine procesa adsorpcije  $\text{Cr}^{6+}$  iz vodenog rastvora na huminske kiseline. Rezultati su pokazali da se ravnoteža najbolje opisuje Freundlich-ovom izotermom. Negativne  $\Delta G$  vrednosti ukazuju na spontanost adsorpcionog procesa. Pozitivne  $\Delta H$  i  $\Delta S$  vrednosti potvrđuju endotermnu prirodu i ireverzibilnost procesa. Proučavani adsorpcioni proces je reakcija drugog reda. Sa povećavanjem koncentracije  $\text{Cr}^{6+}$  u rastvoru, konstanta brzine adsorpcije opada, dok se maksimalni kapacitet adsorpcije povećava. Interakcijom između huminskih kiselina i rastvorenog hroma moguće je smanjiti toksičnost  $\text{Cr}^{6+}$  u vodenom rastvoru.

## 4.2. Termodinamička ispitivanja merenjem toplotnih promena

Prvi način ovih ispitivanja se zasniva na merenju toplotnih promena praćenjem promene temperature sistema u kom se proces odvija u adijabatskim uslovima, koristeći jednačinu (5):

$$Q = m c \Delta T = m c (T_0 - T) = \Delta H \quad (5)$$

gde su:

- Q – toplota generisana tokom reakcije,
- m – masa reaktanata,
- c – specifični toplotni kapacitet,
- $\Delta T$  – promena temperature tokom reakcije,
- $T_0$  – temperatura na početku reakcije,
- T – temperatura na kraju reakcije,
- $\Delta H$  – promena entalpije.

Ovom metodom je moguće dobiti samo vrednosti promene entalpije reakcije.

Drugi način je merenje toplotnih promena preko snage koju generiše kalorimetar, održavajući konstantnu temperaturu sistema pri adijabatskim uslovima. Ukoliko se reakcija odvija putem titracije, praćenje toplotnih promena u toku reakcije vrši se tehnikom izotermalne titracione kalorimetrije (ITC-Isothermal Titration Calorimetry).

### 4.2.1. Termodinamička ispitivanja izotermalnom titracionom kalorimetrijom

Opšti princip ITC zasniva se na merenju toplote koja se oslobađa ili apsorbira u interakciji dva jedinjenja, u uslovima strogo kontrolisane konstantne temperature. U određenu zapreminu uzorka poznate koncentracije dodaje se rastvor titranta (drugog elementa ili jedinjenja

određene koncentracije) u određenim inkrementima, i mere nastale toplotne promene, pri čemu se generiše karakteristični termogram. Odgovarajućom matematičkom obradom dobijenog termograma određuju se promena entalpije, konstanta afiniteta i stehiometrijski odnos reakcije, koje omogućavaju izračunavanje promene slobodne Gibbs-ove energije i entropije reakcije. Takođe, kombinacija sa drugim eksperimentalnim tehnikama omogućava potpunije sagledavanje različitih složenih hemijskih reakcija (*Tan i sar., 2009; Turkeová i sar., 2015A; Loosli i sar., 2015*). Za razliku od drugih tehnika, izotermalna titraciona kalorimetrija omogućava određivanje ne samo intenziteta vezivanja, već i promene entalpije i entropije kao termodinamičkih veličina koje definišu afinitet vezivanja (*Leavitt i Freire, 2001*).

*Bryan i sar. (1998)*, su mikrokolorimetrijskom metodom ispitivali interakciju jona metala ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{La}^{3+}$  i  $\text{Al}^{3+}$ ) sa huminskim i fulvo kiselinama različitih molekulskih masa (od 2800 (vodene fulvo kiseline) do 40500 (huminske kiseline iz treseta)) u vodenom rastvoru pri jonskoj jačini od  $50 \text{ mmol dm}^{-3}$  do  $5 \text{ mol dm}^{-3}$ . Osim interakcije  $\text{La}^{3+}$  pri niskim jonskim jačinama, entalpije su imale pozitivan predznak, odnosno interakcije svih ostalih katjona sa huminskim i fulvo kiselinama su endotermne. Glavni doprinos promeni Gibbs-ove slobodne energije pri razelektrisanju dvostrukog električnog sloja potiče od velikog povećanja entropije.

*Tan i sar. (2009)* su koristili ITC i tehniku dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS-Dynamic Light Scattering) za ispitivanje afiniteta kompleksiranja proteina lizozima i Aldrich komercijalne huminske kiseline. Na osnovu dobijenih rezultata, autori su zaključili da je afinitet kompleksiranja vrlo izražen, da nagrađeni kompleksi lako agregiraju u prisustvu soli, i da (naročito oko izoelektične tačke kompleksa), hidrofobne interakcije imaju najvažniju ulogu. Na osnovu ovoga se može konstatovati da, kada su u životnoj sredini prisutni huminska kiselina i katjonski proteini, agregati će se lako formirati. Agregacija je delimično reverzibilna i stepen agregacije zavisi od pH, koncentracije soli, relativne koncentracije proteina u odnosu na huminsku kiselinu, redosleda dodavanja, kao i od tipa huminske kiseline i proteina. Hidrofobne interakcije i enkapsulacija, koje se prisutne prilikom kompleksiranja i agregacije, mogu da utiču na proteinsku aktivnost.

*Loosli i sar. (2015)* su dali veoma studiozan pristup izučavanju vezivanja  $\text{TiO}_2$  i huminskih kiselina primenom izotermalne titracione kalorimetrije. Kako dobijeni termogrami predstavljaju snagu koju kalorimetar generiše tokom titracije da održi malu i konstantnu razliku u temperaturi između referentne i reakcione ćelije u adijabatskim uslovima, negativni pikovi u termogramu ukazuju da je interakcija između  $\text{TiO}_2$  i huminske kiseline egzoterman proces. Zavisnost promene toplote po molu titranta ( $dQ/dn_T$ ) u funkciji odnosa molarnog naelektrisanja ( $Z = [\text{L}]/[\text{M}]$  ili  $[\text{M}]/[\text{L}]$ ) fitovana je modelom višestrukih nereagujućih mesta (MNIS-Multiple Non-Interacting Sites) (*Courtois i Barret, 2010*). *Loosli i sar. (2015)* su, pod identičnim uslovima, merili zeta potencijal (ZP) i raspodelu veličine čestica dobijenih (Particle Size Distribution - PSD) tehnikama Laser Doppler elektroforeze (Laser Doppler Electrophoresis - LDE) i dinamičkog rasejanja svetlosti (Dynamic Light Scattering - LDS) i dobijene rezultate povezali sa ITC rezultatima. Pri visokim koncentracijama huminske kiseline dolazi do procesa samoagregacije, i ovaj entalpijski favorizovan proces se u najvećoj meri odvija putem mehanizama „zakrpa i mostova“ (patches and bridges). Uporedno korišćenje metode DLS omogućilo je bolje razumevanje mehanizma interakcije (i/ili aglomeracije), kao i prirode sila (hidrofobne, elektrostatičke), u procesu asocijacije. Na osnovu rezultata dobijenih LDE i DLS tehnikama zaključeno je da mehanizmi „zakrpa i mostova“ dovode do formiranja velikih aglomerata kada se postigne inverzija naelektrisanja kompleksa  $\text{TiO}_2$  - huminska kiselina. Osim

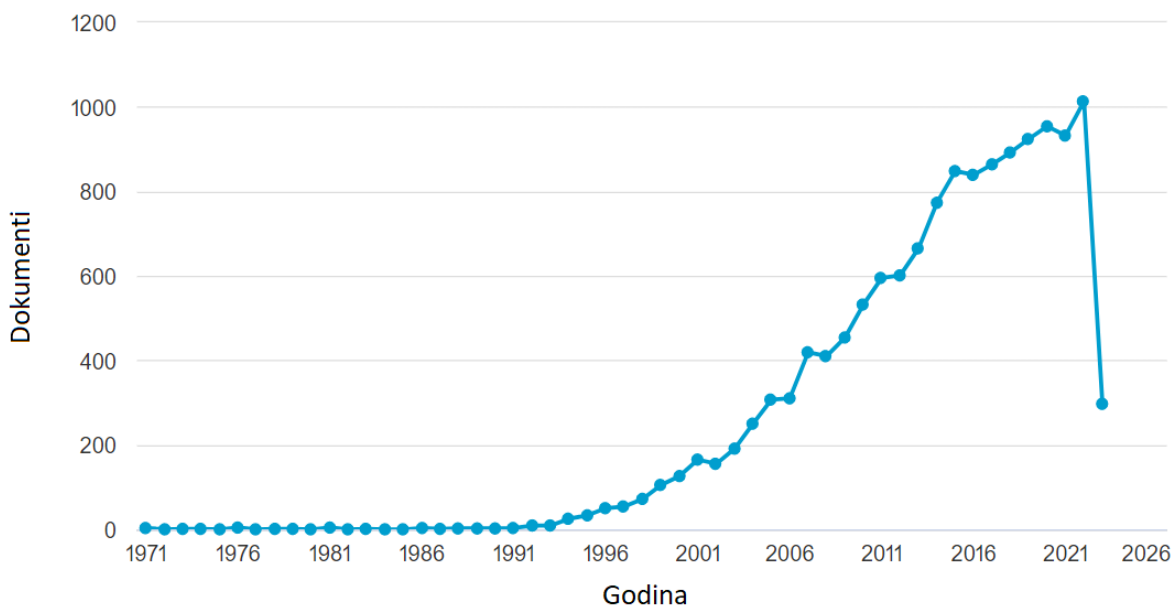
toga, utvrđeno je da Van der Waals-ove interakcije takođe igraju značajnu ulogu u toku interakcionih procesa usled amfifilnog karaktera huminskih kiselina.

*Turkeova i sar. (2015B)* su, takođe, koristeći prethodno optimizovanu metodu ITC, ispitivali interakciju sola huminskih kiselina (iz lignita i komposta) i metalnih jona  $Pb^{2+}$  i  $Cu^{2+}$  kao važnih zagađivača životne sredine. Karakterizacija huminskih kiselina izvršena je korišćenjem NMR i FTIR spektroskopije. Na osnovu ITC merenja, dobijene su termodinamičke veličine ( $\Delta G$ ,  $\Delta H$  i  $\Delta S$ ), kao i konstante vezivanja metalnih katjona i huminskih kiselina. I ovi autori su, kao i prethodni, potvrdili da se metalni joni ne vezuju za huminske kiseline samo kiselim funkcionalnim grupama, kao i da su interakcije dvovalentnih katjona i huminskih kiselina entropijski favorizovane.

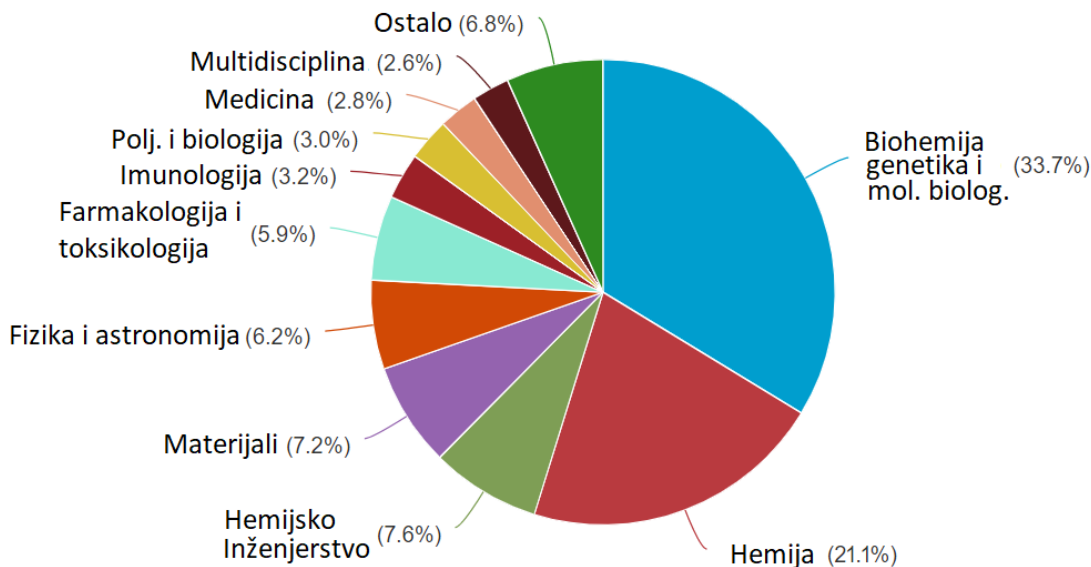
Na osnovu pregleda literature, očigledno je da su termodinamička ispitivanja interakcije metalnih katjona i huminskih kiselina utvrđivanjem ravnotežnih izoterma više zastupljena u odnosu na ispitivanja vršena merenjem toplotnih promena.

Glavna ograničenja izotermalne titracione kalorimetrije su dugo vreme pripreme uzorka i analize, kao i visoke koncentracije huminskih kiselina, koje se iz zemljišta ekstrahuju u relativno malim količinama. Ipak, ITC je nedestruktivna tehnika koja omogućava kvantifikaciju međupovršinskih interakcija, kao i ispitivanje reverzibilnosti i stabilnosti reakcija asocijacije, što je od velikog značaja za sveobuhvatno razumevanje ponašanja i transporta organskih i neorganskih vrsta u zemljišnim i vodenim sistemima. Takođe, ova metoda omogućava pružavanje nastalih strukturnih promena u toku posmatranih interakcija.

Prema Scopus bazi podataka na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnoj reči "isothermal titration calorimetry" dalo je 13.902 dokumenta. Grafički prikaz ovih rezultata ostvarenih po godinama dat je na slici 8a. Grafik ukazuje da je ova tehnika relativno skorijeg datuma i da od devedesetih godina prošlog veka njena primena naglo raste. Procentualna raspodela po oblastima istraživanja data je na slici 8b. ITC tehnika je najzastupljenija u oblastima biohemije, genetike i molekularne biologije. Nešto manja zastupljenost zapaža se u oblasti hemije, dok je u ostalim oblastima zastupljenost svega nekoliko procenata.



Slika 8a. Broj objavljenih radova po godinama za ključne reči pretraživanja „isothermal titration calorimetry” u periodu od 1971–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))



Slika 8b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja za ključnu reč „isothermal titration calorimetry” u periodu od 1971–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

## 5. OSOBINE ARSENA

Arsen (As) je ekstremno toksičan metaloid koji dospeva u zemljište i vode mobilizacijom iz prirodnih izvora, ali i kao rezultat antropogenih aktivnosti od kojih su najvažniji rudarstvo, industrija i poljoprivreda. Usled svoje izražene toksičnosti i zastupljenosti, ovaj element je prepoznat kao jedan od najopasnijih neorganskih zagađivača životne sredine, a posebno izvorišta pijaće vode (*Bissen i Frimmel, 2003*). Čak i pri niskim koncentracijama arsen je izuzetno štetan za ljudsko zdravlje i može izazvati kancer, kardiovaskularne i respiratorne probleme (*Catrouillet i sar., 2015*). Sa ciljem da se zaštiti zdravlje ljudske populacije, preporuka Svetske zdravstvene organizacije je da maksimalna koncentracija arsena u vodi za piće ne prelazi  $10 \mu\text{g dm}^{-3}$  (*WHO, 2022*).

U skladu sa nacionalnom regulativom Republike Srbije, evropskom direktivom i kriterijumima definisanim Dutch standardom za remedijaciju kontaminiranih zemljišta, granične i remedijacione vrednosti koncentracije arsena u zemljištu date su u tabeli 3.

Toksičnost arsena je direktno povezana sa hemijskim oblikom u kom se nalazi i koji zavisi od različitih uslova životne sredine, kao što su pH i redoks potencijal, kao i prisustvo organskih i neorganskih jedinjenja i mikroorganizama (*Ren i sar., 2017*). U životnoj sredini As se primarno javlja u obliku arsenita ( $\text{As}^{3+}$ ) i arsenata ( $\text{As}^{5+}$ ). Usled relativno spore oksidoredukcionne reakcije transformacije, ova dva oblika mogu postojati istovremeno. U životnoj sredini se mogu naći i različita organska jedinjenja arsena. Neorganske vrste arsena su generalno toksičnije od organskih. U odnosu na  $\text{As}^{5+}$ ,  $\text{As}^{3+}$  i njegova jedinjenja su toksičnija, rastvorljivija i mobilnija u životnoj sredini (*Bissen i Frimmel, 2003; Liu i sar., 2011; Costa i sar., 2022*). Suprotno, sadržaj arsenata u kontaminiranim zemljištima je viši u poređenju sa arsenitima (*Garcia-Manyes i sar., 2002*).

Tabela 3. Granične i remedijacione koncentracije arsena u zemljištu ( $\mu\text{g g}^{-1}$  suve materije)

Uredba	Koncentracija arsena		Status zemljišta, koncentracija arsena		
	Granična Vrednost	Remedijaciona Vrednost	Nezagađeno	Potencijalno zagađeno	Alarmantno zagađeno
Sl. glasnik RS <sup>a</sup>	29,0	55,0	29,0	29,0 - 55,0	55,0
86/278/EEC <sup>b</sup>	-	-			
Dutch standard <sup>c</sup>	29,0	55,0			

<sup>a</sup> Sl. glasnik RS, br. 30/2018 i 64/2019 (Uredba o graničnim vrednostima zagađujućih, štetnih i opasnih materija u zemljištu)

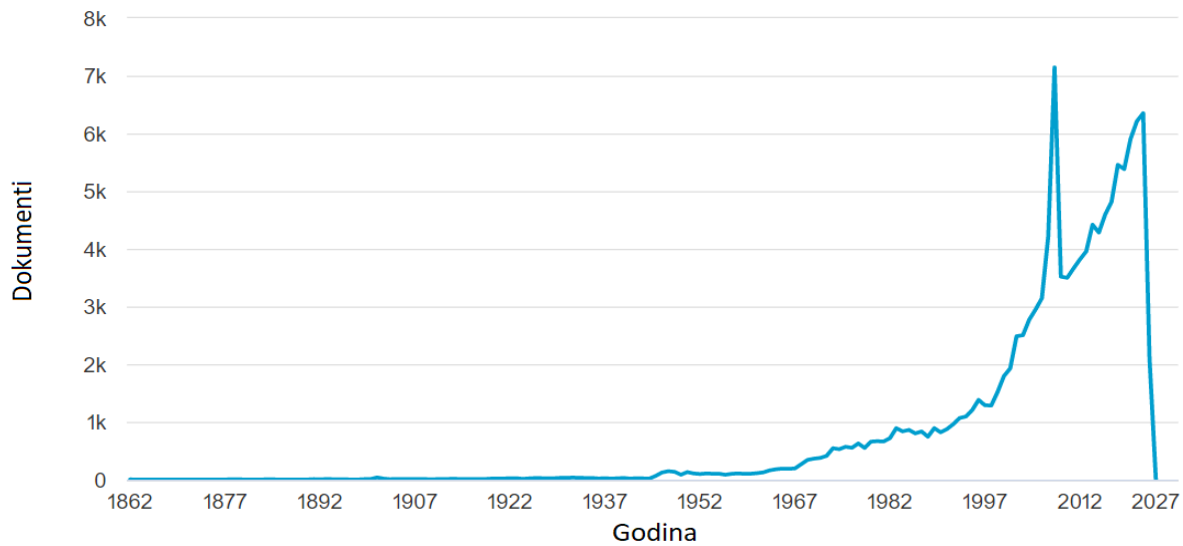
<sup>b</sup> 86/278/EEC Council Directive of 12 June 1986 on the protection of the environment, and in particular of the soil, when sewage sludge is used in agriculture (Official Journal OJ L 181, 8. 7. 1986, Strana 6)

<sup>c</sup> Dutch Target and Intervention Values, Version 4, 2000 (Annex A: Target Values, Soil Remediation Intervention Values and Indicative Levels for Serious Contamination)

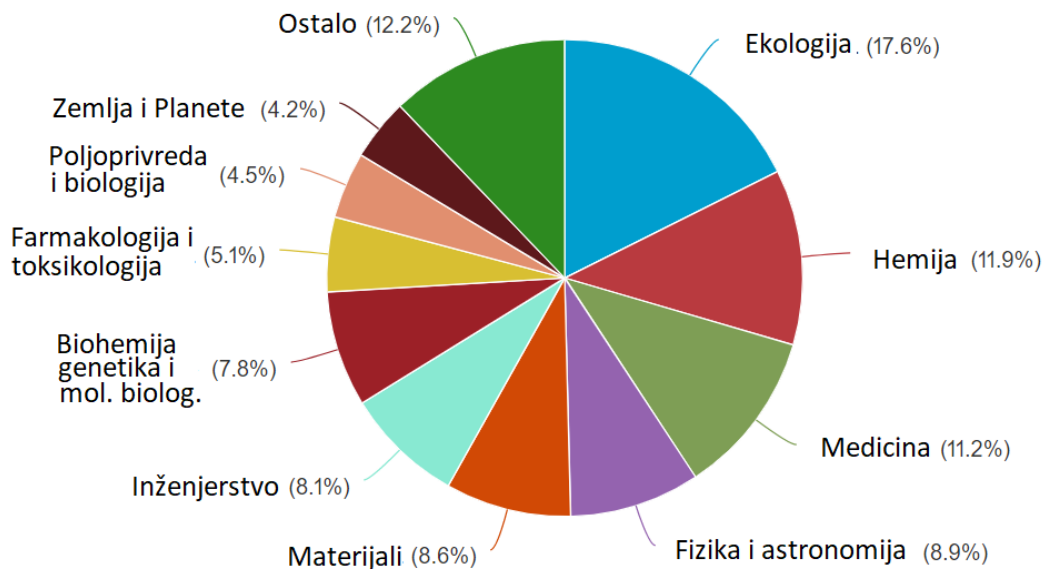
(-) nema podataka za As.

Mobilnost arsena u životnoj sredini je primarno kontrolisana sorpcijom na površinama metalnih oksida. Njegova stabilnost je takođe uslovljena i prisustvom prirodne organske supstance (POS), sa kojom reaguje i gradi As-POS komplekse, koji dalje utiču na adsorpciju arsena na mineralnim površinama, kao i na njegovu rastvorljivost, mobilnost, dostupnost biljkama i toksičnost (*Bissen i Frimmel, 2003; Ren i sar., 2017; Pothier i sar., 2020; Costa i sar., 2022*)

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnoj reči "arsenic" dalo je 126.178 dokumenata. Grafički prikaz rezultata ovog pretraživanja po godinama dat je na slici 9a. Evidentirani rezultati izučavanja arsena datiraju od polovine devetnaestog veka, a izraziti porastje nastupio početkom 60-ih godina prošlog veka. Evidentan skok broja objavljenih radova dogodio se 2008. godine. Procentualna raspodela po oblastima istraživanja data je na slici 9b. U najvećem broju zastupljeni su radovi iz oblasti ekologije, hemije i medicine, dok je zastupljenost u ostalim oblastima ispod 10%.



Slika 9a. Broj objavljenih radova po godinama za ključnu reč pretraživanja „arsenic” u periodu od 1861–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))



Slika 9b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja po ključnoj reči „arsenic” u periodu od 1861–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))



## 5.1. Vezivanje arsena huminskim kiselinama

Mnogi autori su proučavali proces interakcije arsena i huminskih kiselina. *Warwick i sar.* (2005) su ispitivali interakciju  $\text{As}^{3+}$  i  $\text{As}^{5+}$ , kao i organskog oblika arsena (dimetilarsinska kiselina - DMAK) sa huminskom kiselinom, metodom ravnotežnih izoterma pri različitim eksperimentalnim uslovima (pH, jonska jačina, koncentracije arsena i huminske kiseline). Pokazali su da svi ispitivani oblici arsena reaguju sa huminskom kiselinom i da se interakcija odvija vezivanjem metala i deprotonovanih funkcionalnih grupa huminske kiseline. Asocijacija zavisi od pH, jonske jačine i koncentracije arsena. U slučaju  $\text{As}^{5+}$  i DMAK interakcija je intenzivnija u opsegu pH 8-10, dok se za  $\text{As}^{3+}$  taj opseg proširuje do pH 12. Izražena zavisnost od pH vrednosti verovatno je posledica postojanja različitih hemijskih oblika arsena u vodenim rastvorima. Dobijene vrednosti konstanti asocijacije ukazuju na formiranje nestabilnih kompleksa arsena i huminske kiseline.

Kompleksiranje  $\text{As}^{3+}$  i standardne huminske kiseline proučavano je kombinacijom različitih analitičkih tehnika (SEC-UV i ICP-MS), koje omogućavaju merenje koncentracije kako slobodnog, tako i huminskom kiselinom kompleksiranog arsena (*Liu i Cai, 2010*). Koeficijent raspodele ( $K_d$ ), koji ukazuje na kapacitet huminske kiseline za vezivanje arsena, i prividna konstanta stabilnosti ( $K_s$ ), koja se odnosi na stabilnost formiranog kompleksa, određeni su sa ciljem da se karakteriše ispitivana reakcija kompleksiranja. Primenjen je model vezivanja liganda za dve vrste aktivnih centara, koji uzima u obzir heterogenost centara vezivanja huminske kiseline i klasifikuje ih kao jake (S1) i slabe (S2). Dobijeni rezultati pokazuju da  $K_d$  vrednosti rastu sa porastom pH. Suprotno, vrednosti  $\log K_s$  se smanjuju sa porastom pH, naročito za S1 centre.

*Liu i Cai (2013)* su proučavali interakciju  $\text{As}^{3+}$  i huminske kiseline primenom SEC (Size exclusion chromatography) metode u kombinaciji sa UV spektrofotometrijom i ICP-MS tandem tehnikom. Ova kombinovana tehnika omogućava direktno razdvajanje formiranih kompleksa  $\text{As}^{3+}$  - huminska kiselina i slobodnog arsena u rastvoru. Dobijeni rezultati su obrađeni primenom Scatchard-ove zavisnosti i nelinearne regresije modela vezivanja liganda. Zaključeno je da, u skladu sa definicijom huminskih kiselina kao polielektrolita, u reakciji kompleksiranja učestvuju dve grupe aktivnih centara vezivanja huminske kiseline (S1 i S2), za koje su izračunate odgovarajuće konstante stabilnosti.

*Fakour i Lin (2014 A)* su ispitivali efekte huminske kiseline na kinetiku adsorpcije/desorpcije arsena, kao i na promene njegovih vrsta. Praćene su interakcije arsenata i arsenita sa huminskom kiselinom različitih koncentracija, u prisustvu adsorbenta na bazi oksida gvožđa u različitim eksperimentalnim uslovima relevantnim za životnu sredinu. Eksperimentalno dobijeni podaci adsorpcije/desorpcije fitovani su teorijskim kinetičkim modelima adsorpcije pseudo-prvog i drugog reda. Rezultati su ukazali na značajan efekat prisustva huminskih kiselina na kinetiku adsorpcije i redoks transformacije različitih vrsta arsena, pa samim tim i na ponašanje, transport i mobilnost arsena u životnoj sredini.

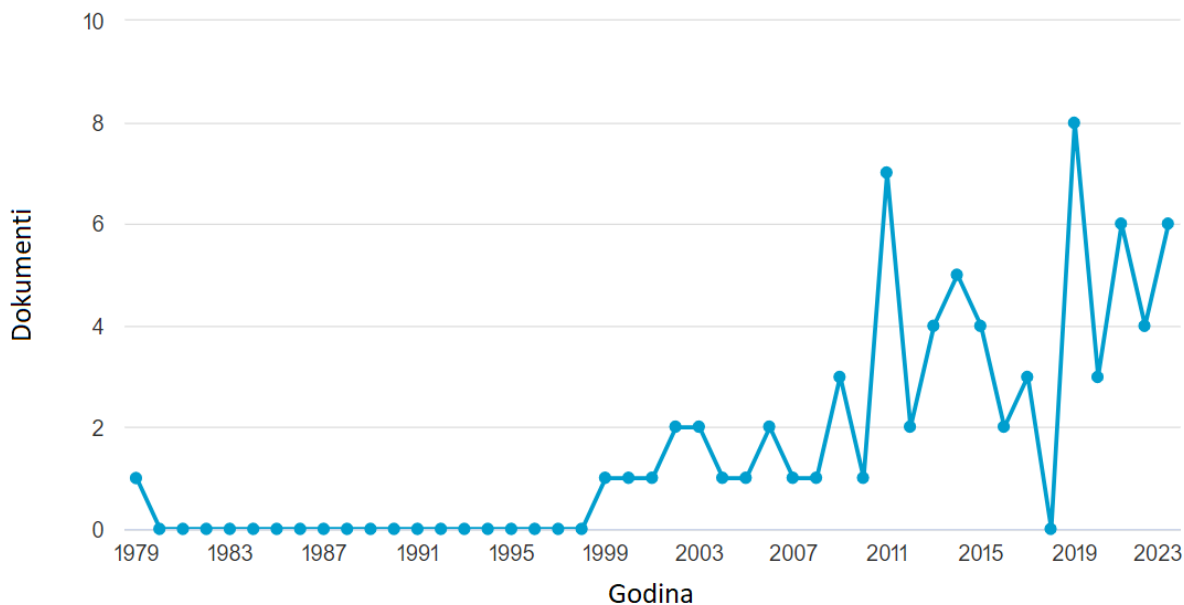
Kompleksiranje huminskih i fulvo kiselina sa arsenom u vodi bilo je predmet istraživanja istih autora (*Fakour i Lin, 2014 B*). Na osnovu dobijenih eksperimentalnih rezultata zaključeno je da arsen formira komplekse sa huminskim i fulvo kiselinama, kao i da je afinitet izraženiji za arsenate. U prisustvu adsorbenta na bazi oksida gvožđa, vezivanje arsena za huminske i fulvo kiseline bilo je značajno slabije, što je verovatno posledica adsorpcije arsena, huminske i fulvo kiseline na površini adsorbenta. Razvijeni model vezivanja liganda za dve vrste aktivnih centara

pokazao je da je broj S2 centara desetostruko veći za huminske, kao i za fulvo kiseline. Koncentracije obe vrste aktivnih centara bile su proporcionalne koncentraciji huminske kiseline, dok se konstante stabilnosti nisu menjale sa promenom koncentracije huminske kiseline. Rezultati ovih istraživanja bi mogli da nađu primenu u izboru efikasnijih metoda za tretman prirodnih voda na bazi adsorpcije.

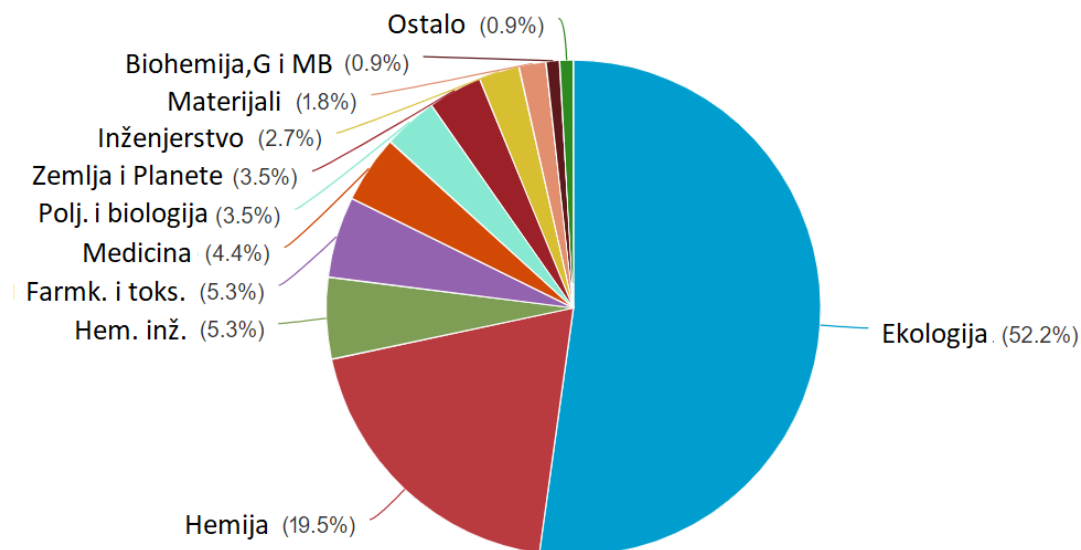
Pored navedenih eksperimentalnih tehnika, interakcija arsena i huminskih kiselina ispitivana je i tehnikama dijalize, voltametrije, fluorescencije (*Lenoble i sar., 2015*), ravnotežne dijalize (*Buschmann i sar., 2006*), "batch" ravnotežnom metodom (*Catrouillet i sar., 2016*), "batch" i eksperimentima u koloni (*Qian i sar., 2022*), diferencijalnom pulsnom polarografijom (*Ren i sar., 2017*), tangencijalnom protočnom ultrafiltracijom (*Costa i sar., 2022*), itd.

Na osnovu napred izloženog, evidentno je, da je ispitivanje interakcije arsena i huminskih kiselina vršeno različitim eksperimentalnim tehnikama, sa ciljem određivanja koeficijenta raspodele i konstante stabilnosti kao osnovnih parametara formiranja kompleksa

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnim rečima "humic acids & arsenic & binding" dalo je 72 dokumenta. Grafički prikaz ovih rezultata po godinama dat je na slici 10a, a procentualna raspodela po oblastima istraživanja data je na slici 10b. Preko 50% čine radovi iz oblasti ekologije, zastupljenost u oblasti hemija je oko 20%, dok zastupljenost u ostalim oblastima iznosi samo nekoliko procenata.

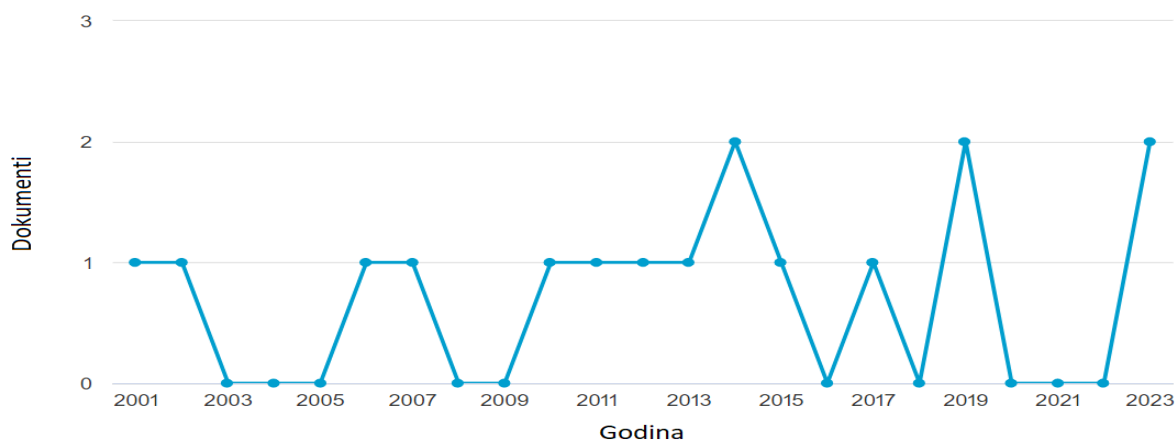


Slika 10a. Broj objavljenih radova po godinama za ključne reči pretraživanja „humic acids & arsenic & binding” u periodu od 1979–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

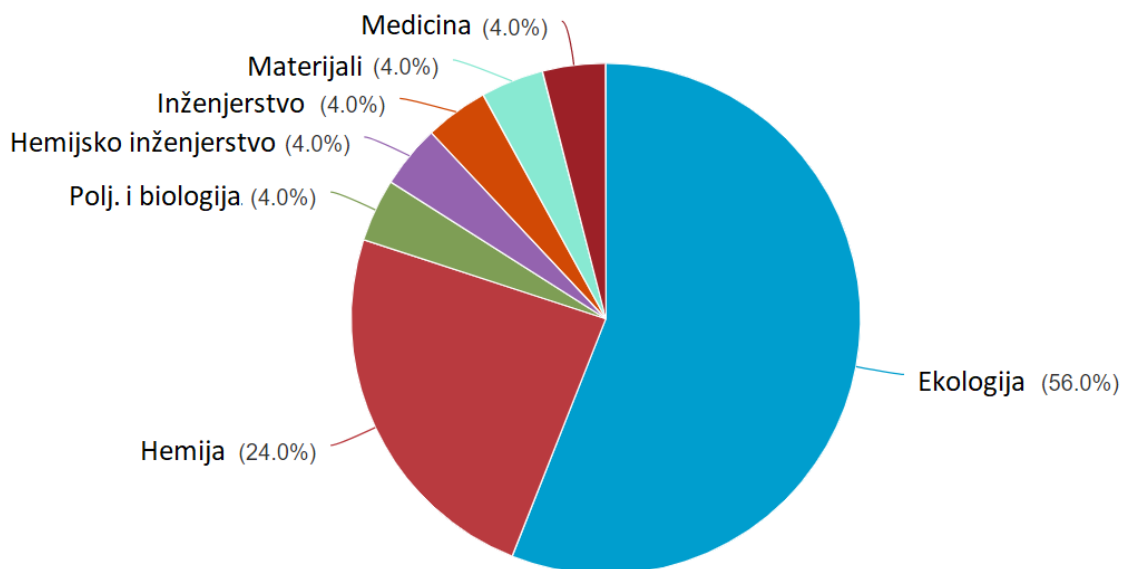


Slika 10b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja za ključne reči „humic acids & arsenic & binding” u periodu od 1979–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanje po ključnim rečima "humic acids & arsenite & binding" dalo je 16 dokumenata (15 radova i 1 revijalni rad). Grafički prikaz ovih rezultata po godinama dat je na slici 11a, a procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja data je na slici 11b. 56% čine radovi iz oblasti ekologije, zastupljenost u oblasti hemija čini oko 24% radova, dok ostale oblasti učestvuju sa po 4%.



Slika 11a. Broj objavljenih radova po godinama po ključnim rečima „humic acids & arsenite & binding” u periodu od 2001–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))



Slika 11b. Procentualna raspodela objavljenih radova po oblastima istraživanja za ključne reči „humic acids & arsenite & binding” u periodu od 2001–27.04.2023. (Izvor: [www.scopus.com](http://www.scopus.com))

Prema Scopus bazi podataka, na dan 27.04.2023. godine, pretraživanjem po ključnim rečima "humic acids & arsenite & isothermal titration calorimetry" dobijaju se samo dva rada. Prvi (*Martin i sar., 2009*) se odnosi na ispitivanje procesa vezivanja arsenita i sistema ferihidrit-kaolinit u prisustvu huminske kiseline ITC tehnikom. U drugom radu (*Čokeša i sar., 2023*) publikovan je deo rezultata proisteklih u toku izrade ove disertacije.

Analizom prikazanih rezultata pretraživanja Scopus baze podataka može se zaključiti sledeće:

1. Izučavanje huminskih kiselina datira od kraja 19. veka, s tim da je intenzivirano u poslednjih 50 godina.
2. Izučavanje arsena datira od polovine 19. veka. Kao i u slučaju huminskih kiselina, do naglog porasta broja radova došlo je u poslednjih 50 godina.
3. Izučavanje vezivanja metala i huminskih kiselina počinje desetak godina posle porasta broja radova koji proučavaju osobine huminskih kiselina, i ima značajan uspon sve do danas, što ukazuje na aktuelnost i značaj ispitivanja ovih interakcija.
4. Izučavanje vezivanja arsena i huminskih kiselina je skorijeg datuma i broj dokumenata je relativno mali, a naročito onih koji se odnose na  $As^{3+}$  (16 radova, od kojih 1 revijalni).
5. Prethodno navedena izučavanja su najviše zastupljena u oblasti ekologije, a nešto manje u oblasti hemije.
6. Period primene ITC eksperimentalne tehnike ispitivanja interakcija je relativno kratak, sa naglim porastom u poslednjih 20 godina, s tim da je ova tehnika najviše korišćena u oblastima mikrobiologije, genetike i molekularne biologije. Nešto manje je primenjivana u oblasti hemije, dok je primena u oblasti ekologije neznatna.

Na osnovu izloženog literaturnog pregleda može se zaključiti, da ispitivanje procesa vezivanja arsena i huminskih kiselina u sistemu u kome su ovo jedine prisutne komponente, do sada nije vršeno tehnikom izotermalne titracione kalorimetrije. Primenom ITC u ispitivanju ovih interakcija dobijaju se toplote reakcije, kao i termodinamički i reakcioni parametri interakcije arsena i huminske kiseline. Vrednosti ovih veličina, koje ukazuju na dominantno prisutan tip interakcije, mehanizmi vezivanja i struktura formiranog kompleksa, nisu poznati u literaturi. Izložene činjenice nedvosmisleno ukazuju na potrebu ispitivanja procesa interakcije arsena i huminskih kiselina sa istraživačkog aspekta.

Kao što je već istaknuto, vezivanje arsena huminskim kiselinama iz zemljišta utiče na njegovu mobilnost, rastvorljivost i bioraspoloživost, tako da je ispitivanje ovog procesa izuzetno značajno i sa stanovišta zaštite životne sredine. Bez obzira na veću zastupljenost arsenata u kontaminiranim zemljištima, interakcija  $As^{3+}$  sa huminskim kiselinama je izabrana kao predmet izučavanja ove doktorske disertacije, upravo zbog njegove izraženije toksičnosti i mobilnosti u životnoj sredini.

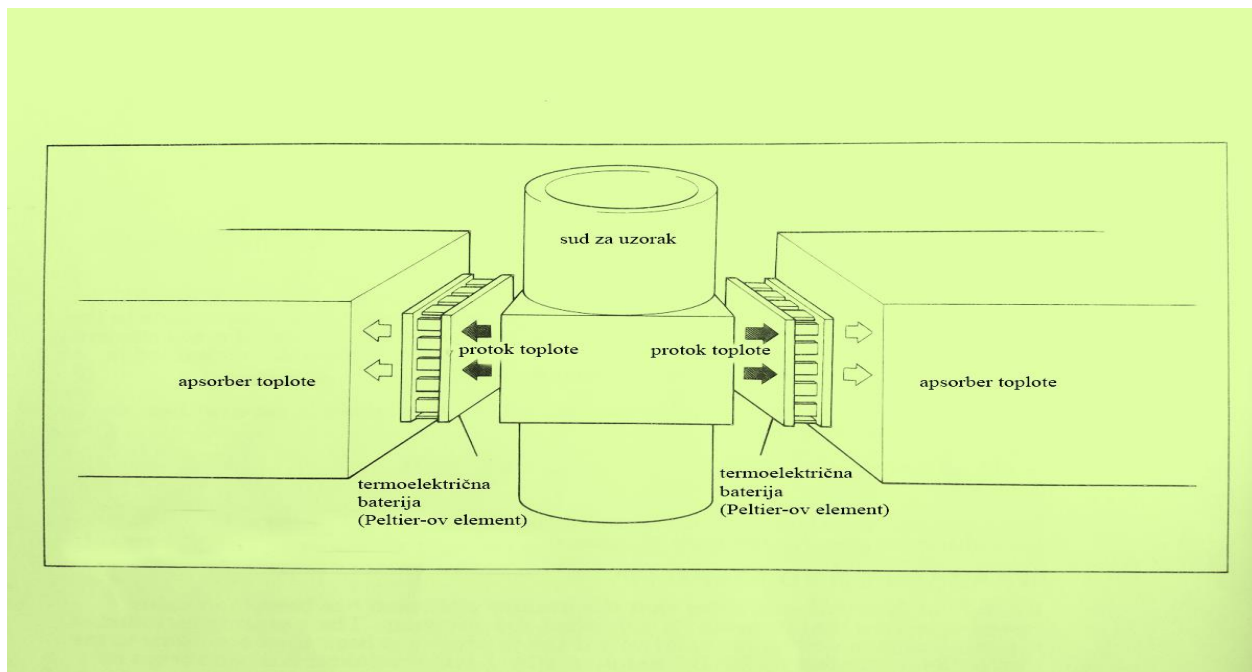
## 6. OPREMA ZA ISPITIVANJE

Oprema za ispitivanje uključuje: monitor termalne aktivnosti, automatski titrator i uređaj za merenje veličine čestica i zeta potencijala.

### 6.1. Monitor termalne aktivnosti

Toplotni efekti interakcije  $As^{3+}$  i huminskih kiselina mereni su korišćenjem monitora termalne aktivnosti (TAM) (LKB, model 2277). Ovaj monitor omogućava praćenje toplotnih promena na nivou delova  $\mu W$ , tako da se mogu detektovati temperaturne promene manje od  $10^{-6}$  °C. Ove karakteristike čine TAM povoljnim za praćenje toplotnih efekata velikog broja hemijskih i bioloških reakcija. Reakcija se odvija u reakcionom sudu titracione ćelije. Titracija uz mešanje se izvodi u titracionoj ćeliji, koja se postavlja u merni cilindar TAM-a.

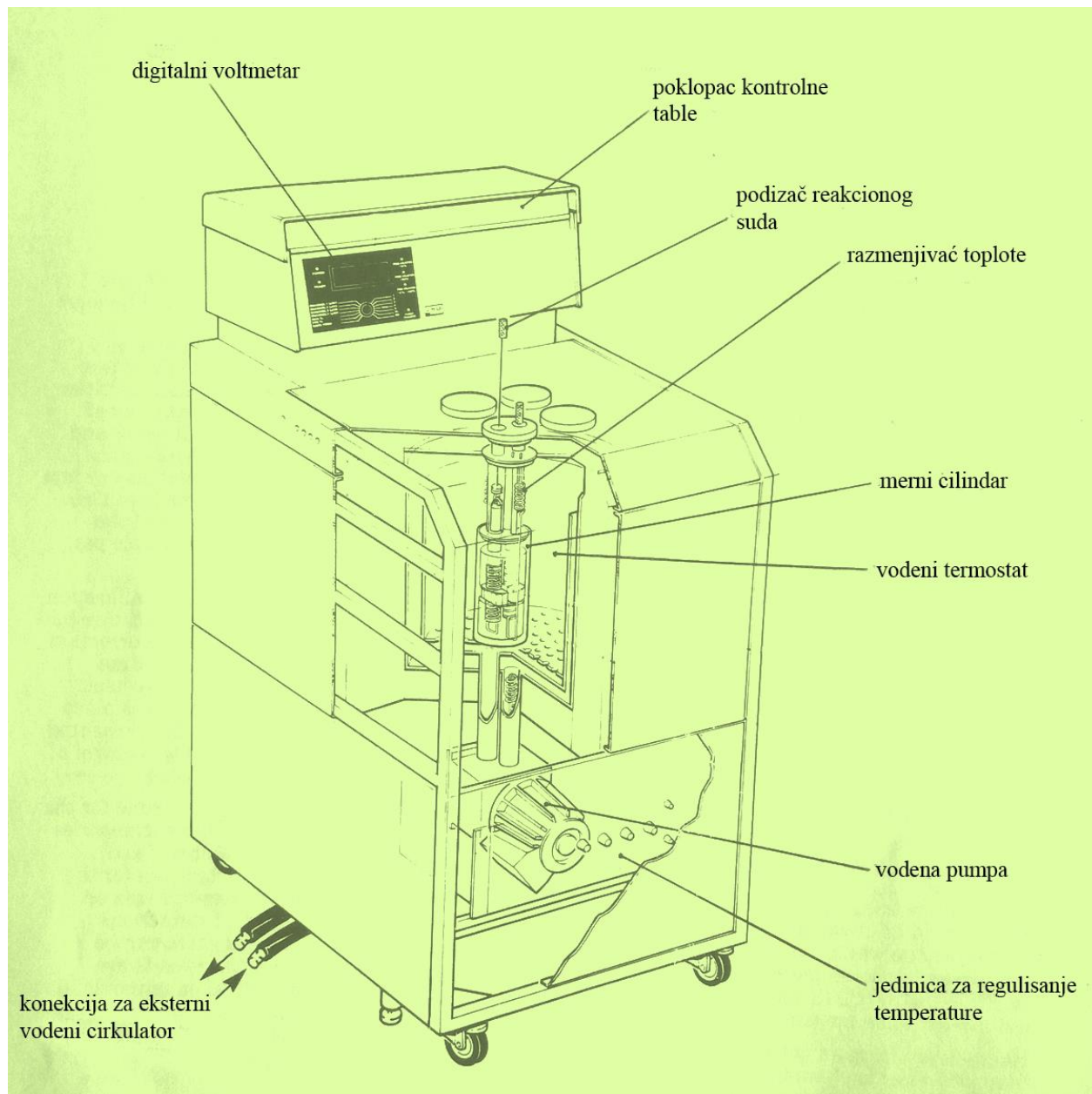
TAM je četvorokanalni mikrokolorimetrijski sistem koji prati toplotne promene u temperaturno definisanim reakcionim ćelijama merenjem dodate (endotermni procesi) ili oduzete (egzotermni procesi) toplote. Dodata ili oduzeta toplota prolazom kroz termoelektrične baterije (Peltier-ov element) generiše odgovarajuću električnu struju, preko koje se vrši kvantifikacija razmenjene toplote (slika 12). Temperaturna stabilnost sistema postiže se tako što su merni cilindri, u kojima se nalaze reakcione ćelije, uronjeni u vodeni termostatski od 25 dm<sup>3</sup> koji ih održava na konstantnoj temperaturi  $\pm 2 \cdot 10^{-4}$  °C. Svaki cilindar, zajedno sa svojim pojačivačem, čini nezavisni merni kanal, tako da su sva četiri kanala istovremeno operativna.



Slika 12. Princip merenja razmene toplote

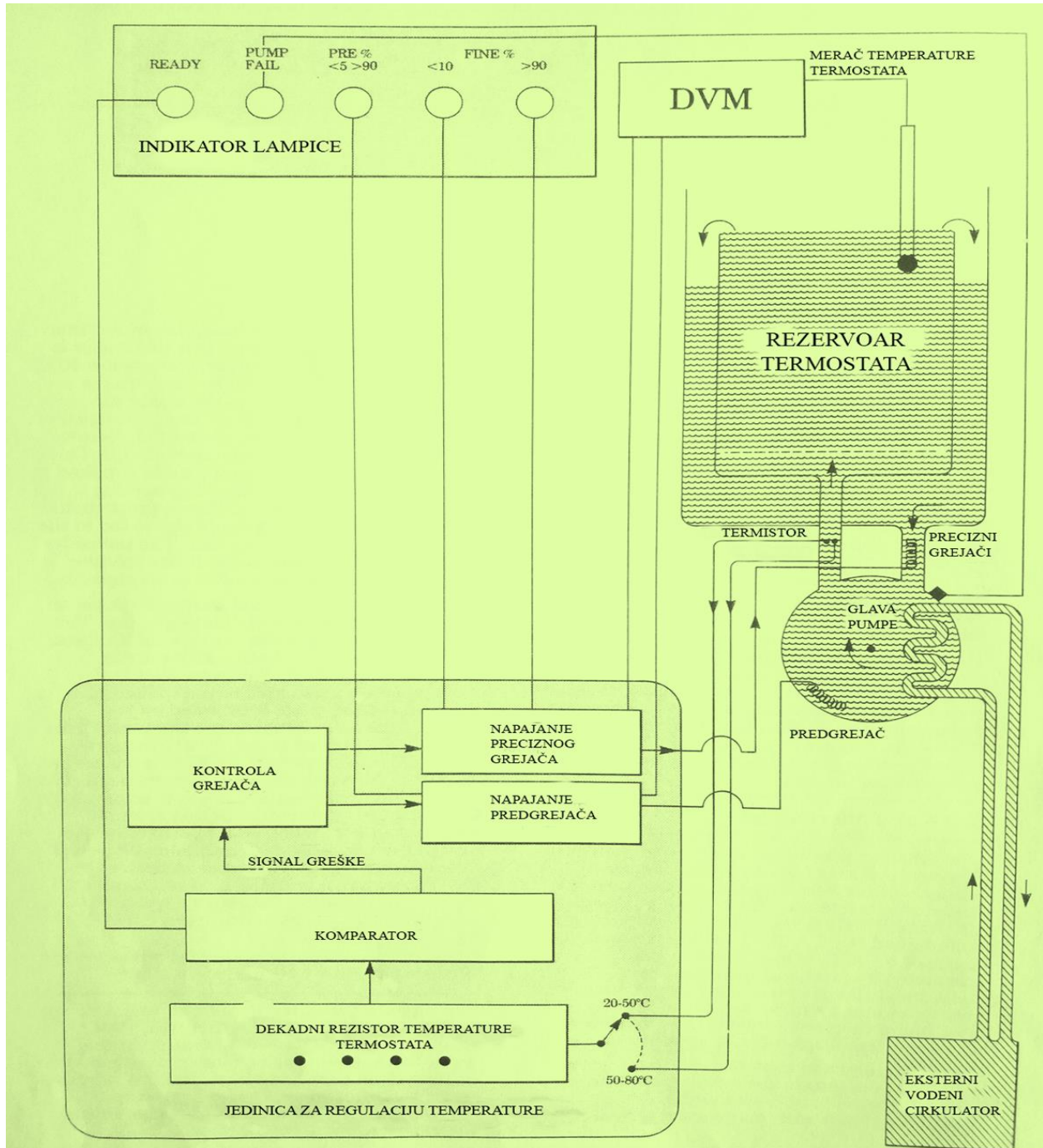
### 6.1.1. Opis i postupak rada monitora termalne aktivnosti

TAM se sastoji od vodenog termostata, spoljašnjeg cirkulatora, vodene pumpe, jedinice za regulaciju i kontrolu temperature, kontrolne table, digitalnog voltmetra i računara (slika 13). U vodenom termostatu smeštena su 4 merna cilindra. Na kontrolnoj tabli nalaze se 4 pojačivača, izvor napajanja za titracionu ćeliju i digitalna kalibraciona jedinica.



Slika 13. Monitor termalne aktivnosti

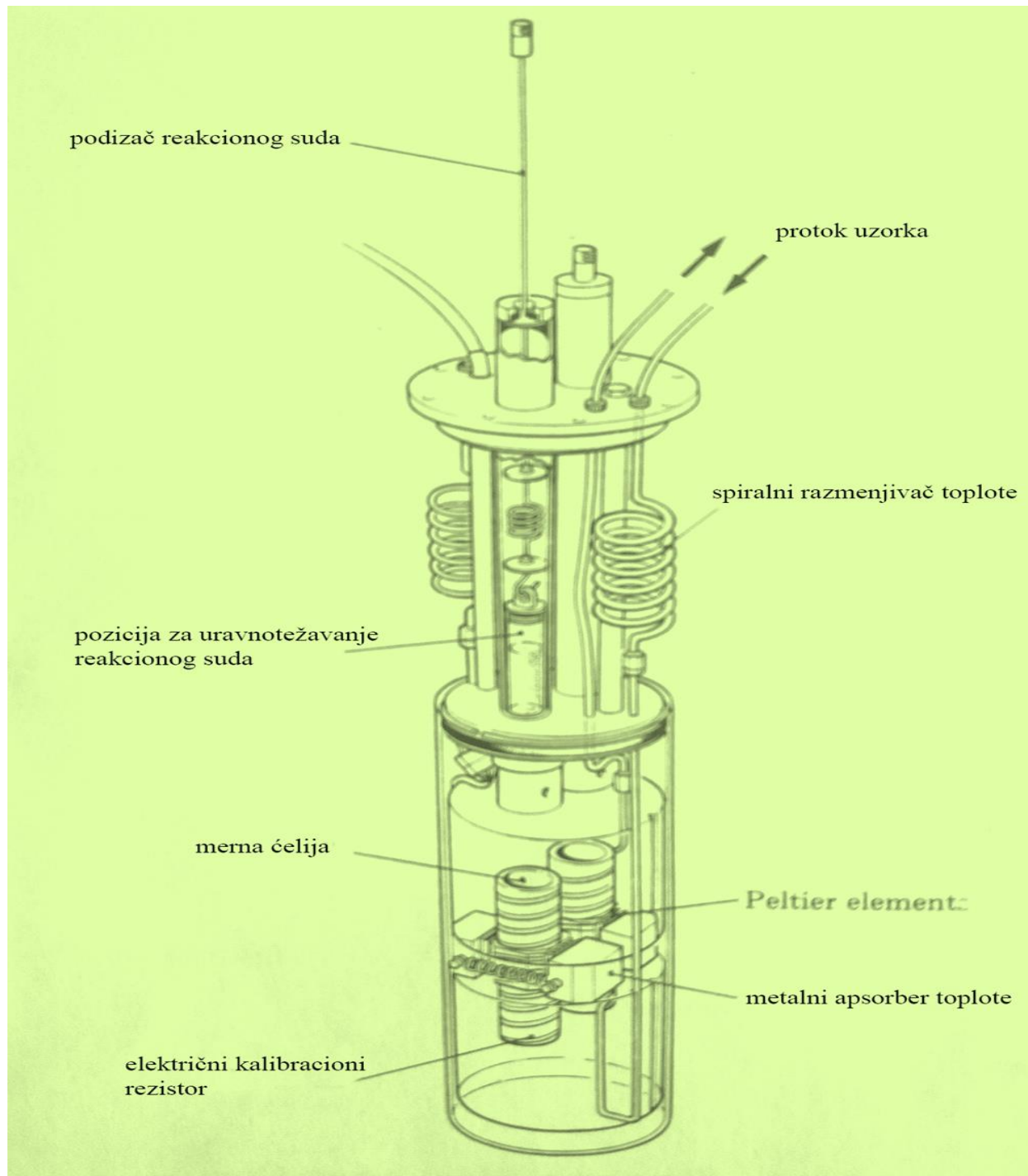
Vodeni termostat se sastoji od rezervoara sa duplim zidovima u kome su smešteni merni cilindri. Voda se pomoću pumpe preko preciznog grejača, predgrejača, hladnjaka cirkulatora i temperaturnog senzora iz vodenog omotača uvodi na dno rezervoara, iz koga se preliva u vodeni omotač. Ovakav sistem omogućava precizno održavanje zadate temperature unutar rezervoara. Podešavanje i kontrola temperature unutar termostata vrše se pomoću jedinice za regulisanje temperature. Princip rada vodenog termostata je shematski prikazan na slici 14.



Slika 14. Sistem kontrole vodenog termostata

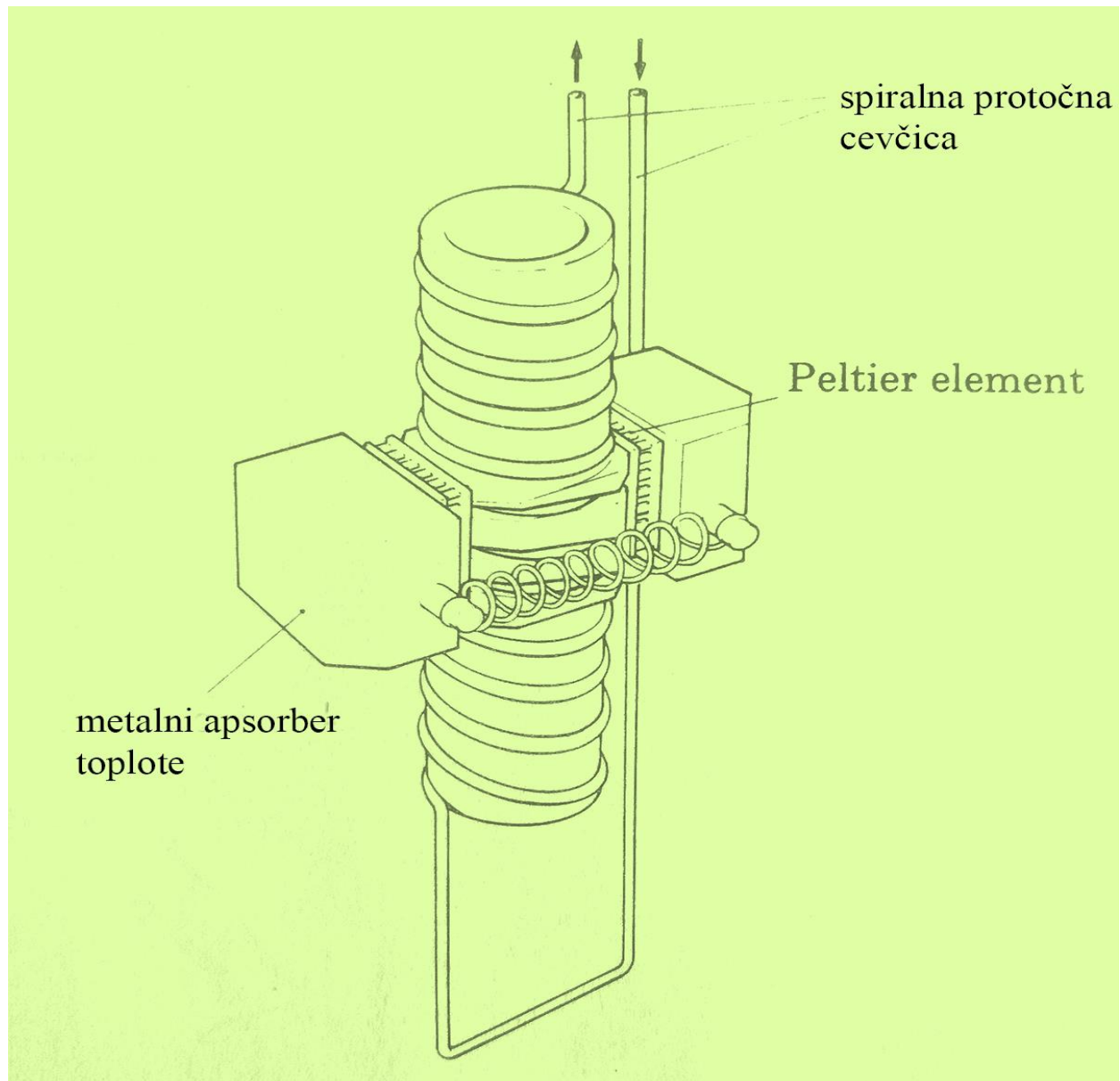


U kanalima broj 1 i 2 su instalirani kombinovani merni cilindri (slika 15), koji prihvataju reakcione sudove od nerđajućeg čelika ( $5,0 \text{ cm}^3$ ) ili stakla ( $2,5 \text{ cm}^3$ ).



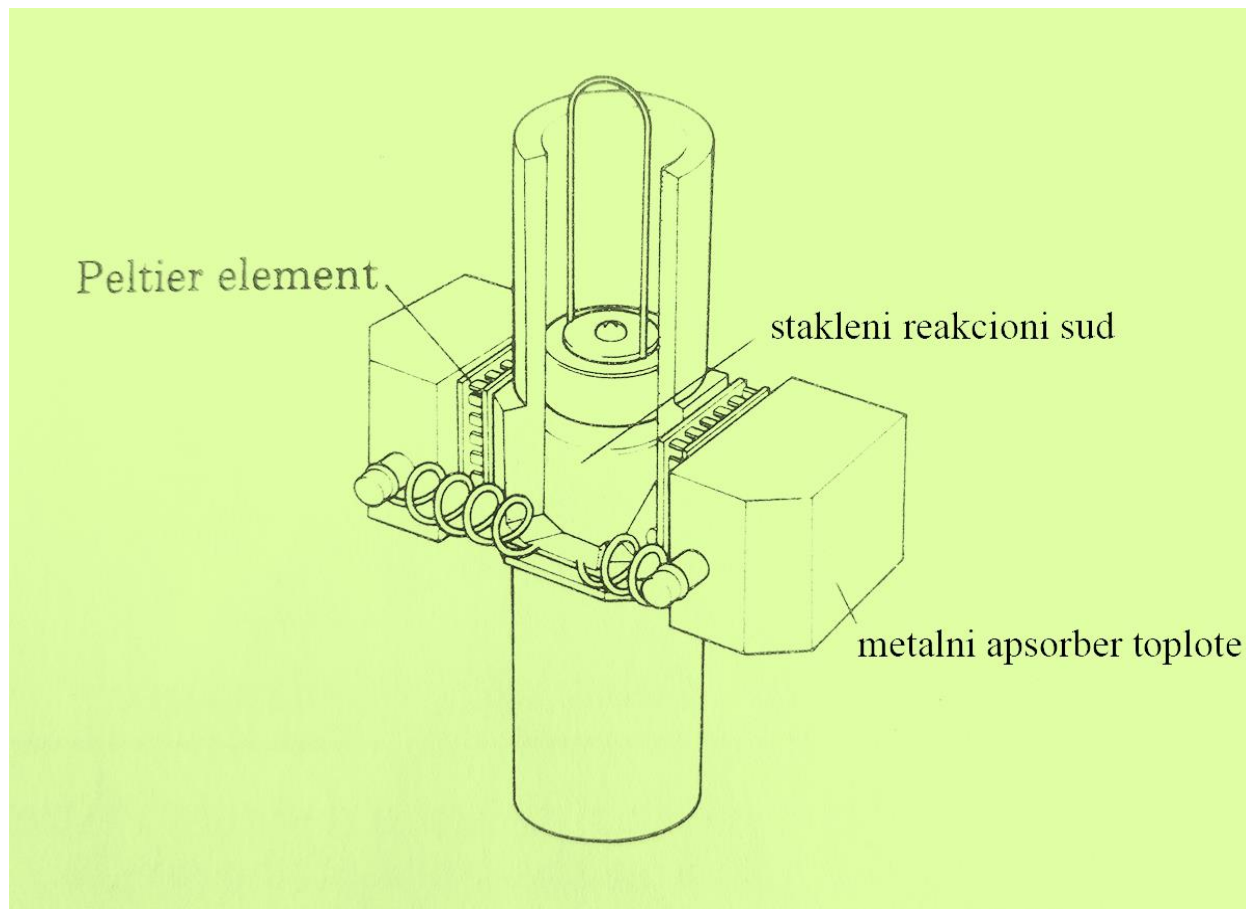
Slika 15. Kombinovani merni cilindar

Ovi cilindri imaju spiralnu cevčicu od zlata, namotanu na zid merne ćelije, koja omogućava protočna merenja (slika 16).



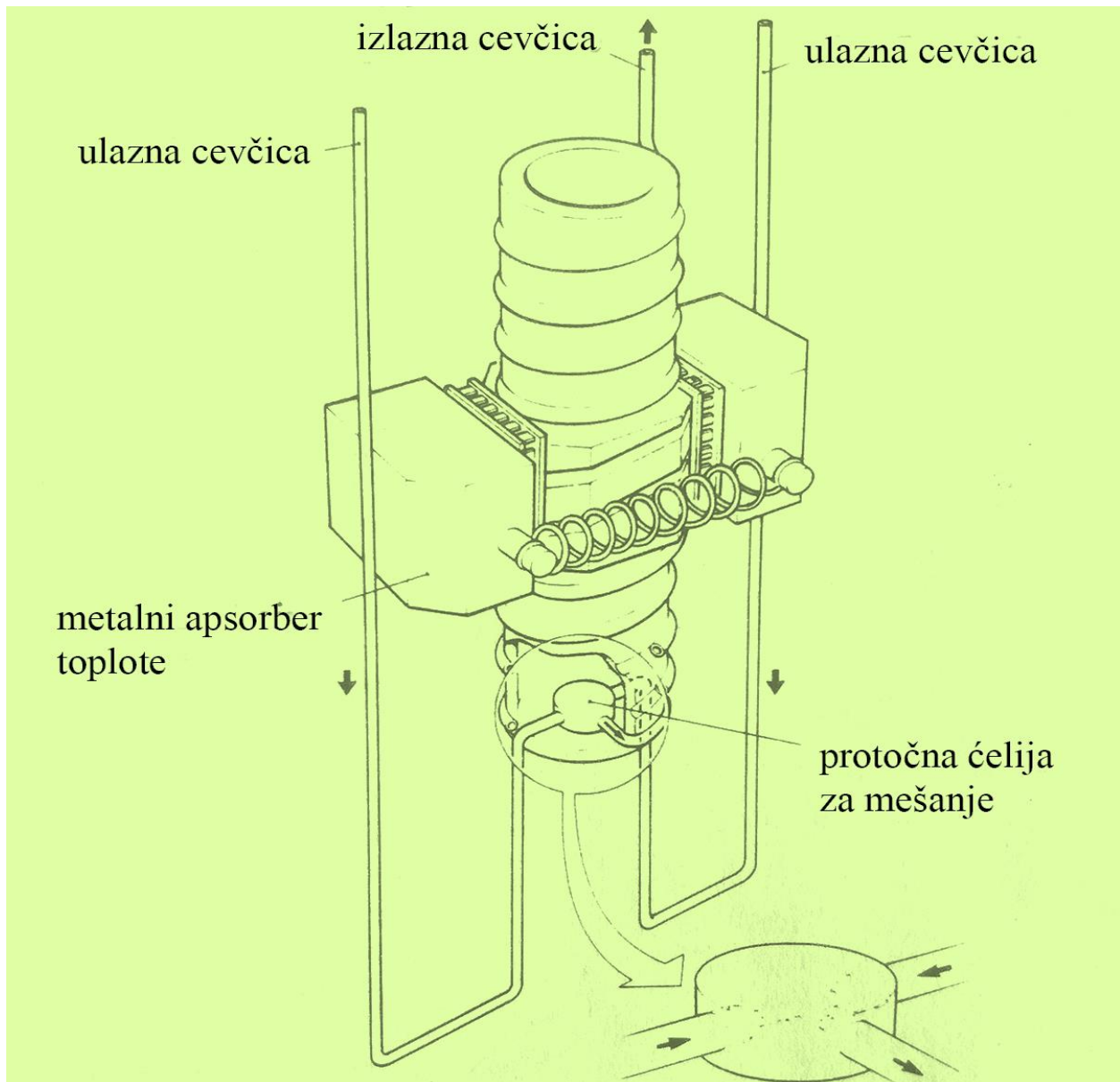
Slika 16. Ćelija protočnog mernog cilindra

Merni cilindar u kanalu 3 ne poseduje cevčice za protočna merenja, što ga čini stabilnijim i najpogodnijim za merenja sa titracionom ćelijom (slika 17).



Slika 17. Čelija mernog celindra kanala 3

Kanal 4 ima najsloženiji merni cilindar koji, za razliku od cilindara u kanalima 1 i 2, dodatno poseduje i ćeliju za mešanje (slika 18).

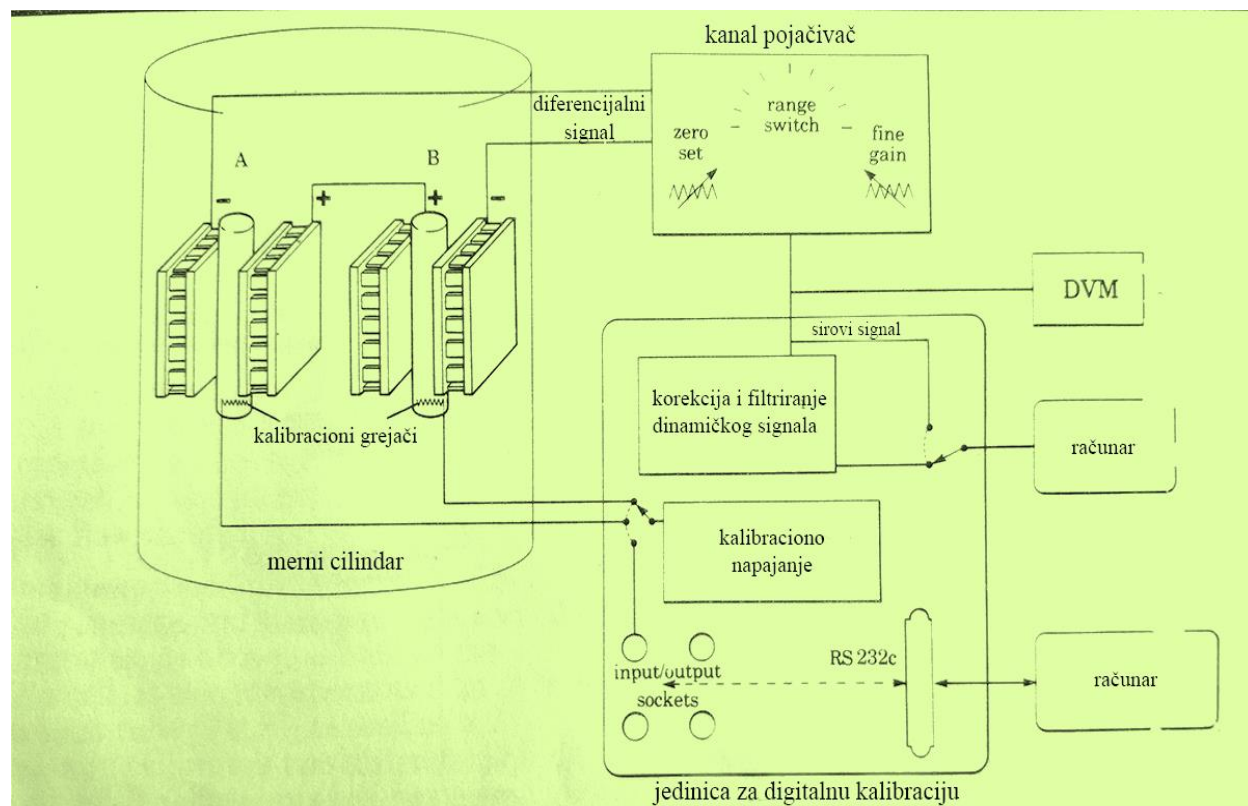


Slika 18. Ćelija mernog celindra sa protočnom ćelijom za mešanje

Prvi korak u postupku rada TAM-a je podešavanje rada vodenog termostata. Za odabranu temperaturu ispitivanja toplotnih promena na osnovu tabele proizvođača podese se parametri jedinice za regulaciju i kontrolu temperature, kao i temperatura spoljašnjeg cirkulatora. Zadana temperatura je postignuta kada zelena sijalica READY svetli, što znači da je temperatura vodenog termostata stabilna unutar opsega  $\pm 5 \cdot 10^{-4}$  °C. Kada se jednom postigne stabilna

temperatura termostata, neophodno je sačekati najmanje 6 sati (preporučeno preko noći), zbog stabilizacije temperature mernih cilindara.

Električna kalibracija kao sledeći korak obavlja se kada se monitor koristi prvi put, ukoliko je došlo do promene eksperimentalnih uslova ili do nestanka struje. Na slici 19 prikazan je blok dijagram mernog sistema sa digitalnom kalibracionom jedinicom.



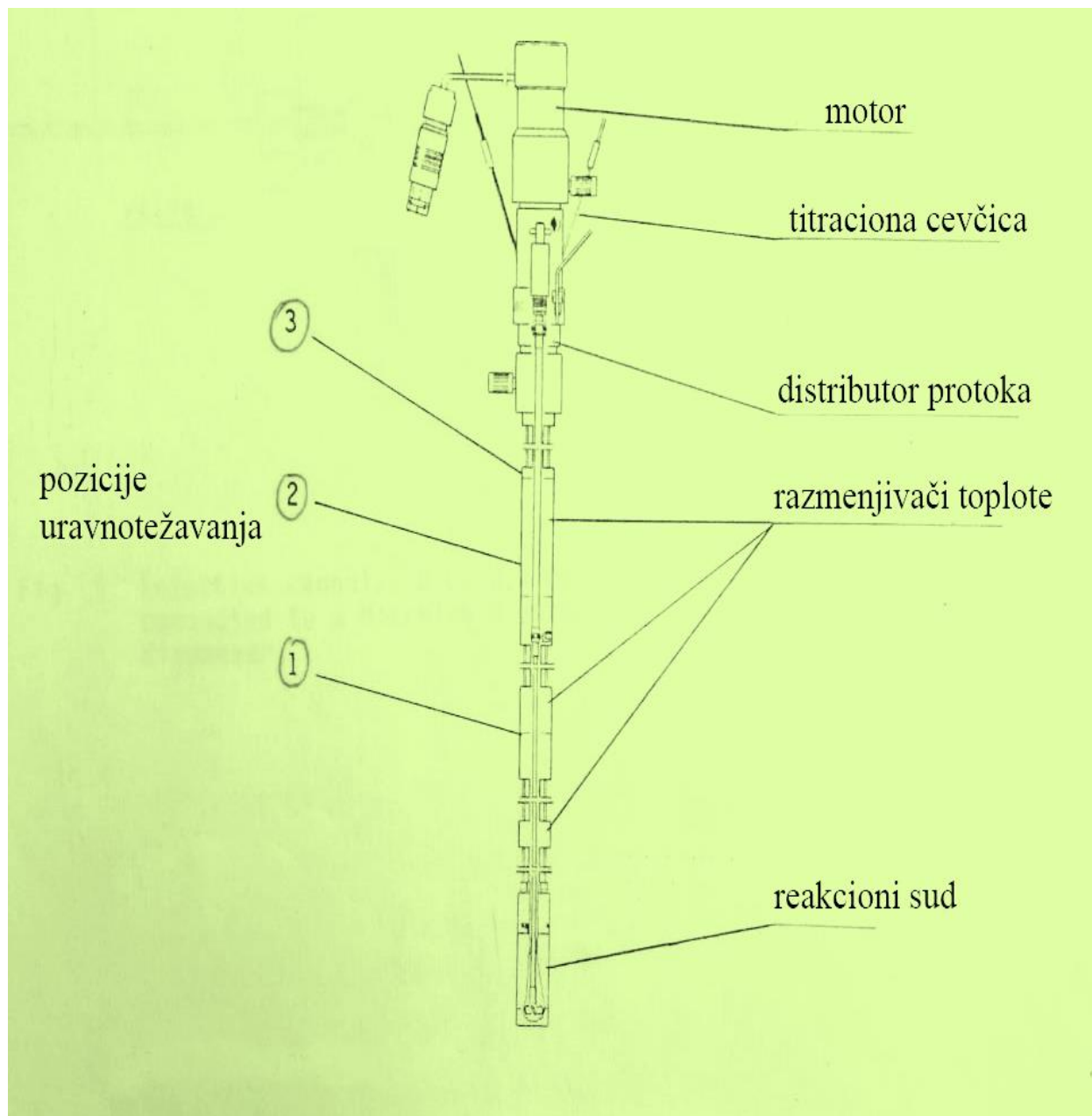
Slika 19. Blok dijagram mernog sistema

Svaki pojačivač ima sedam opsega merenja (3, 10, 30, 100, 300, 1000 i 3000  $\mu\text{W}$ ). U toku kalibracije struja izabranog opsega prolazi kroz odgovarajući grejač ugrađen u obe merne ćelije svakog cilindra, pri čemu se oslobađa tačno definisana količina toplote. Tako se dobije kalibracioni toplotni nivo na osnovu koga se vrši kvantifikacija ispitivanih toplotnih promena.

Pre ispitivanja toplotnih efekata određene reakcije preporučuje se izvođenje preliminarnog eksperimenta, na osnovu kog se utvrđuje opseg podešavanja pojačivača i vremenska skala reakcije.

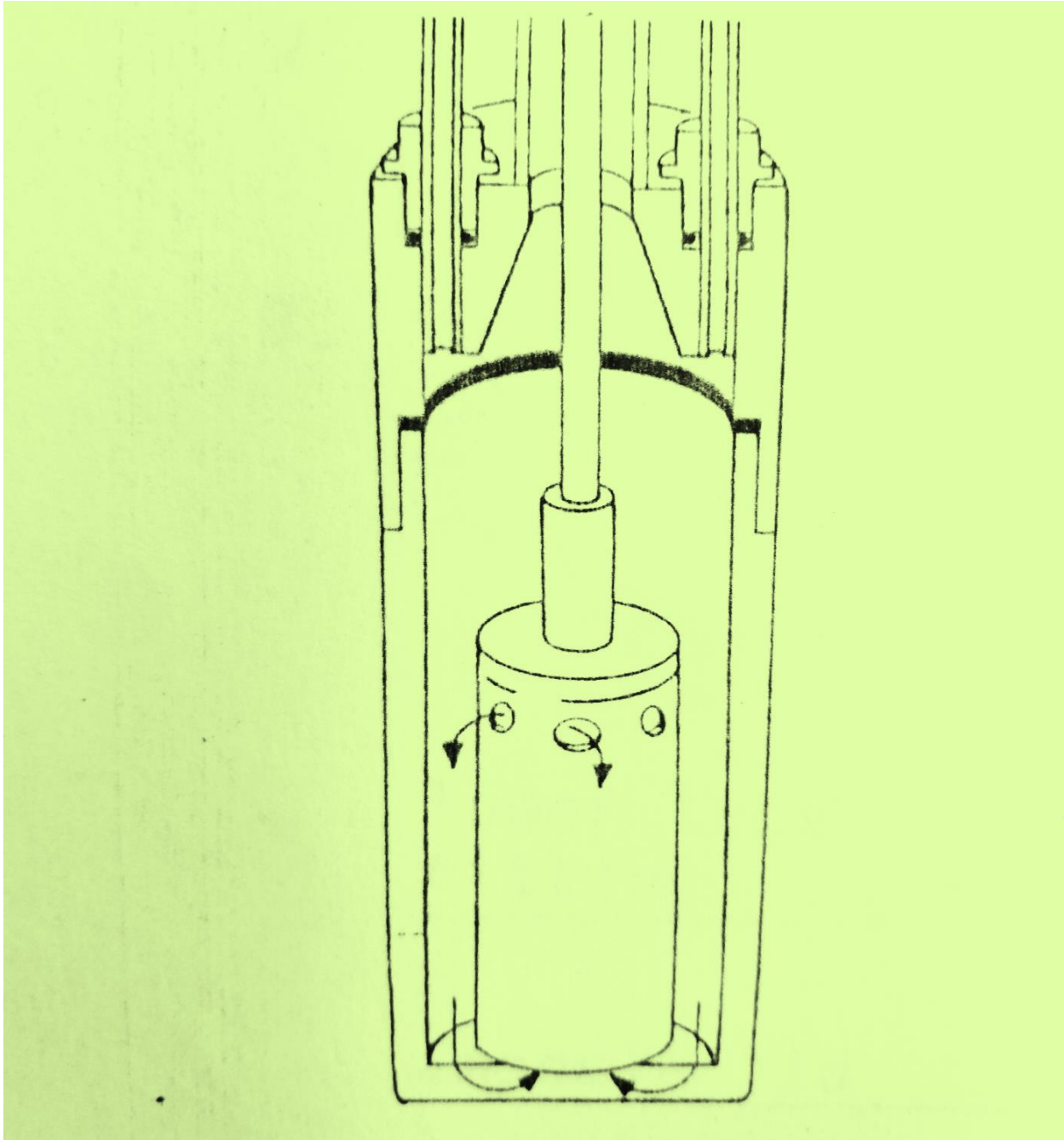
### 6.1.2. Opis i postupak rada titracione ćelije

Titraciona ćelija se sastoji od reakcionog suda, toplotnog izmenjivača, distributera protoka, titracionih cevčica, mešalice i motora sa jedinicom za napajanje. Reakcioni sud po izboru može biti zapremine 1, 2 ili 3,5 cm<sup>3</sup> (slika 20).



Slika 20. Titraciona ćelija

Mešanje reakcionih komponenti obezbeđuje se turbinskom i/ili propelerskom mešalicom. Izbor tipa mešalice vrši se van TAM-a korišćenjem transparentnog suda identičnog reakcionom. Na slici 21 prikazan je reakcioni sud sa turbinskom mešalicom. Izbor broja i smera obrtaja, kao i intervala mešanja u toku merenja, vrši se jedinicom za napajanje.



Slika 21. Reakciona ćelija sa turbinskom mesalicom

Titraciona ćelija može da radi u titracionom i perfuzionom modu. U perfuzionom modu tečnost se kontinualno propušta kroz reakcioni sud pri protoku do  $25 \text{ cm}^3 \text{ h}^{-1}$ .

U titracionom modu tečan ili čvrst uzorak se unosi u reakcioni sud pre spuštanja ćelije u TAM. Nakon termostatiranja, automatskim titratorom titrant se uvodi kroz injekcionu kanulu spoljnog prečnika  $0,4 \text{ mm}$ . Preporučena količina titranta je  $10 \text{ mm}^3$ .

## 6.2. Automatski titrator

Za dodavanje titranta korišćena je automatska bireta (Radiometer ABU 80) koja je sastavni deo automatskog titratora (Radiometer TTT 85), (slika 22.).

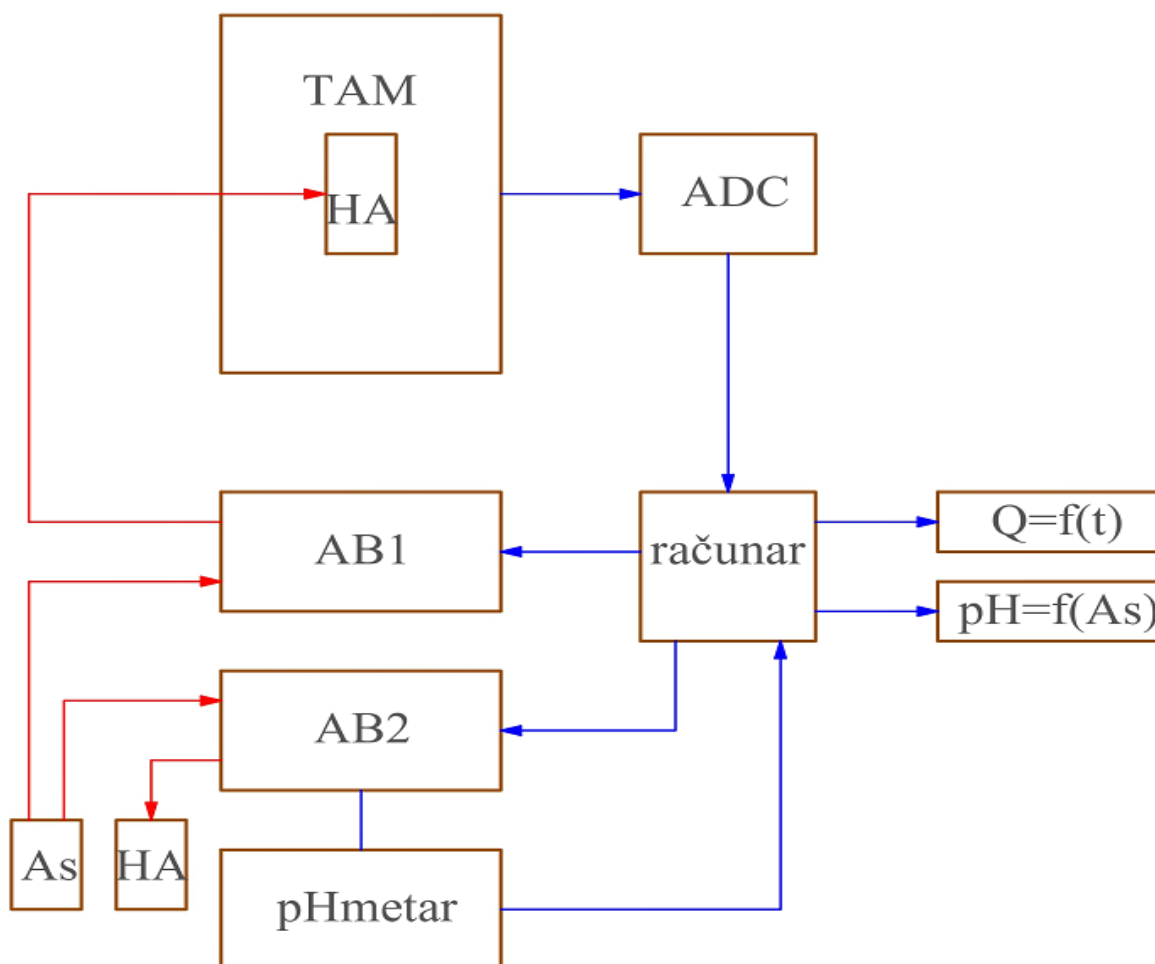


Slika 22. Automatski titrator

Radna zapremina staklene birete je  $0,25 \text{ cm}^3$ . Bireta ima mogućnost izbora brzine dodavanja titranta. Radom automatskog titratora upravlja računar po zadatom programu koji definiše količinu titranta i učestalost dodavanja.



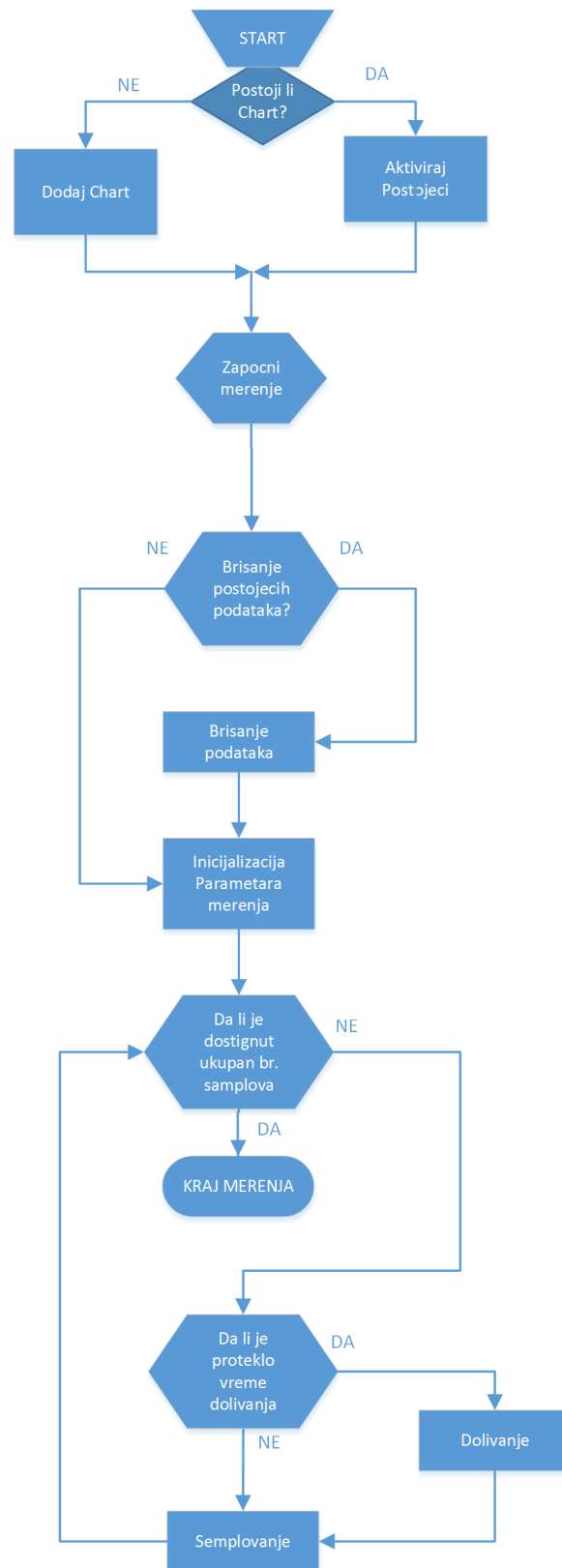
Upravljanje TAM-om i automatskim titratorom vrši se personalnim računarom pomoću hardvera i softvera razvijenih u Laboratoriji za hemijsku dinamiku i permanentno obrazovanje Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Blok šema ITC sistema i algoritam upravljanja merenjima dati su na slikama 23 i 24.



Slika 23. Blok šema sistema za ITC merenja

Analogni signal generisan u TAM-u se u analognu-digitalnom konvertoru (ADC) prevodi u digitalni i uvodi u računar za obradu podataka. Na osnovu algoritma prikazanog na slici 24, računar daje digitalni izlazni signal automatskoj bireti (AB1). Bireta u određenom trenutku zadatom brzinom dodaje definisanu zapreminu rastvora  $As^{3+}$  u reakcioni sud sa huminskom kiselinom.

Isti računar kontroliše i rad birete AB2 koja vrši pH-metrijsku titraciju pod identičnim uslovima kao i pri ITC merenjima, pri čemu se digitalni signal sa pH-metra generiše u obliku zavisnosti pH vrednosti od dodate zapremine rastvora  $As^{3+}$ .



Slika 24. Algoritam upravljanja ITC merenjima

### 6.3. Uređaj za određivanje raspodele veličine čestica i zeta potencijala

Raspodela veličine čestica i promena zeta potencijala u toku titracije praćeni su korišćenjem zeta-sizer-a sa He-Ne laserskom svetlošću talasne dužine 633 nm (Malvern, Nano ZS) (slika 25).



Slika 25. Zeta-sizer za određivanje veličine čestica i zeta potencijala

Upravljanje merenjem i analiza rezultata vršeni su računarnom (program Zetasizer Software Version 6.20 (Malvern)).

Velicina čestica se određuje tehnikom dinamičkog rasejanja svetlosti (DLS) primenom detekcije pozadinskog rasejanja na  $173^\circ$ . Korišćene su kivete od polistirena (Sarstedt). Provera rada instrumenta izvršena je merenjem dva standarda za veličinu čestica (polistirenske nano čestice veličine 60 i 220 nm u vodi, Nanosphere™ Size Standards, Duke Scientific Corporation)

Zeta potencijal se izračunava Henry-jevom jednačinom na osnovu elektroforetske mobilnosti merene tehnikom laser Doppler elektroforeze (LDE). Merenja se vrše u kapilarnim ćelijama sa elektrodama, posebno dizajniranim za ovu namenu (Malvern). Rad instrumenta se proverava merenjem standarda vrednosti zeta potencijala od -50 mV (Malvern).

## 7. MATERIJALI I METODE

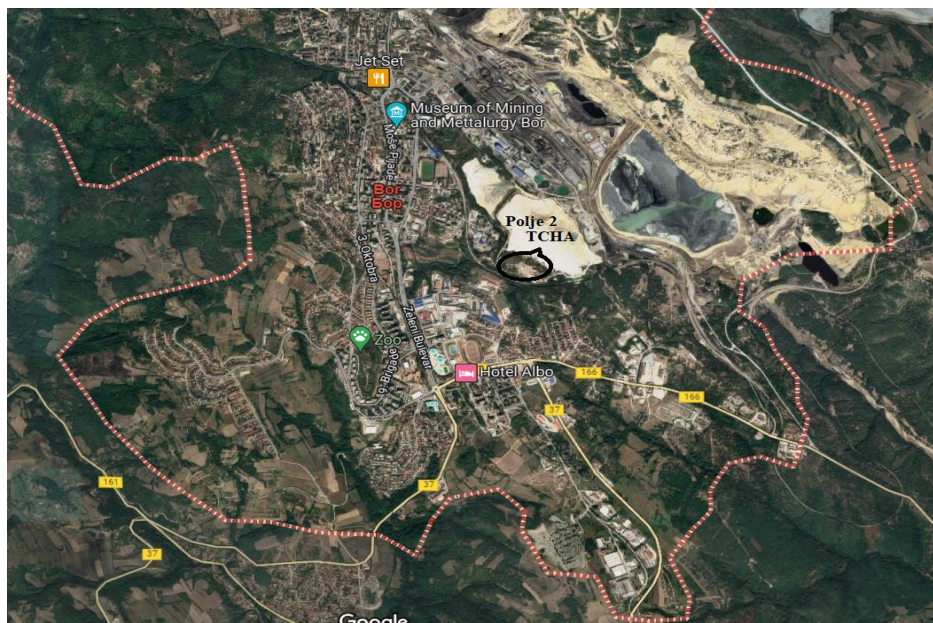
Pregledom literature u oblasti interakcije huminskih kiselina i raznih hemijskih vrsta utvrđeno je da ne postoje termodinamički podaci o interakciji arsena i huminskih kiselina, na osnovu čega je evidentna potreba da se ovaj proces ispita primenom ITC tehnike. Potpuniji uvid u prirodu vezivanja arsena i huminskih kiselina dodatno su omogućile LDE i DLS tehnike.

Glavna ograničenja izotermne titracione kalorimetrije su dugo vreme pripreme uzorka i analize, kao i visoke koncentracije huminskih kiselina, koja se iz zemljišta ekstrahuje u relativno malim količinama. Ipak, ITC je tehnika koja omogućava kvantifikaciju međupovršinskih interakcija, kao i ispitivanje reverzibilnosti i stabilnosti reakcija asocijacije, što je od velikog značaja za sveobuhvatno razumevanje ponašanja i transporta organskih i neorganskih vrsta u zemljišnim i vodenim sistemima. Takođe, ova metoda omogućava razumevanje nastalih strukturnih promena u toku posmatranih interakcija.

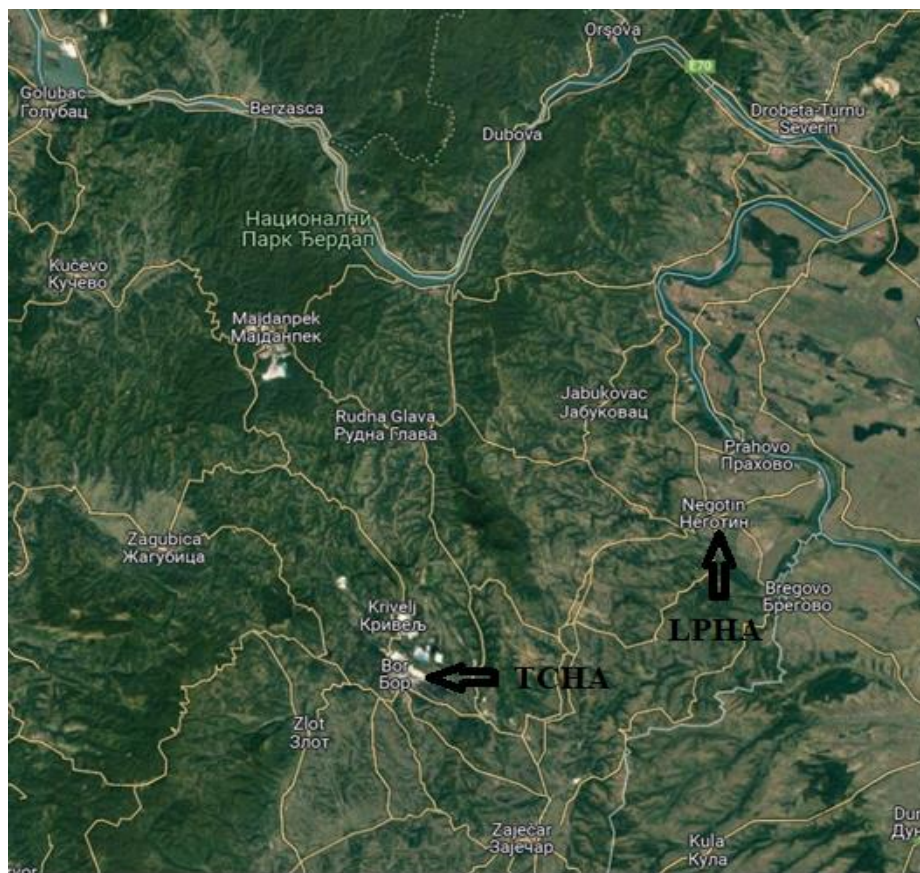
Ha osnovu dosadašnjih istraživanja u ovoj oblasti, u ovom radu izvršen je izbor materijala i metoda eksperimentalnog ispitivanja interakcije  $As^{3+}$  i huminskih kiselina tehnikom ITC. Takođe, odabran je odgovatajući teorijski model za tumačenje dobijenih rezultata.

### 7.1. Izbor i opis huminskih kiselina

Rekultivacija jednog dela jalovišta Rudarsko-topioničarskog basena Bor (danas Serbia Zijin Bor Copper doo Bor), nastalog flotacijom bakra, izvršena je 1991. godine i taj deo je nazvan „Polje 2“ (slika 26.).



Slika 26. Lokalitet uzorkovanja tehnosola (TC) - Bor, Polje 2



Slika 27. Lokalitet uzorkovanja zemljišta Leptosol (LS) - Negotin

Rekultivacija je izvršena prekrivanjem jalovišta slojem zemljišta iz okoline Bora debljine oko 40 cm. Na jednom delu posejana je trava, a na drugom zasađeno drveće. U proteklom periodu nije vršena dodatna obrada zemljišta. Tokom vremena formirao se sloj tehnosola (TC) debljine oko 45 cm, koji je heterogena smeša dodatog zemljišta i jalovine u različitim odnosima. Formirani tehnosol odlikuje se degradiranom strukturom, niskim sadržajem humusa, kiselim karakterom, visokim koncentracijama As i Cu, kao i slabom aktivnošću zemljišnih mikroorganizama (Lilić i sar., 2014).

Uzorak tehnosola uzet je sa dubine od 0 do 25 cm na rekultivisanom jalovištu. Izdvajanje huminske kiseline (TCHA) izvršeno je modifikovanom IHSS (International Humic Substances Society) metodom (*Source Materials for IHSS Samples*, <http://humic-substances.org/source-materials-for-ihss-samples>, 2017). U cilju poređenja HA iz tehnosola sa huminskim kiselinama koje nisu tehnogenog porekla, korišćene su dve huminske kiseline različitog porekla. Prva (LPHA) je istom metodom izolovana iz obradivog zemljišta (Rendzic Calcaric Leptosol (Loamic)) iz okoline Negotina (slika 27.). Druga (ESHA) je IHSS (IHSS-International Humic Substances Society) standardna huminska kiselina izolovana iz zemljišta Elliot soil (*USDA-NRCS Elliot Series*, 2015).

Karakterizacija navedenih huminskih kiselina prikazana je u tabelama 4, 5, 6 i 7.

Tabela 4. Elementalni sastav, sadržaj pepela, atomski odnos i stepen unutrašnje oksidacije ( $\omega$ ) huminskih kiselina TCHA, LPHA i ESHA (*Radmanović i sar., 2020*)

Uzorak	C	H	O	N	Ash	C/N	O/C	H/C	O/H	$\omega$
HA	wt% (bez pepela i vlage)				%	Atomski odnos				
TCHA	53,68	5,46	35,81	4,91	0,002	12,76	0,490	1,221	0,401	-0,006
LPHA	51,82	4,80	39,98	3,40	0,19	17,80	0,721	1,111	0,649	0,215
ESHA	58,13	3,68	34,08	4,14	0,88	16,39	0,770	0,743	1,037	0,981

Tabela 5. Sadržaj funkcionalnih grupa i veličina čestica najintenzivnijeg pika u raspodeli veličina čestica huminskih kiselina LPHA, i standarda ESHA (*Jovanović i sar., 2022*)

Uzorak HA	Sadržaj funkcionalnih grupa, $\text{mqe gC}^{-1}$		d, nm
	Karboksilne	Fenolne	
LPHA	$8.2 \pm 1,2$	$3,0 \pm 1,1$	32,66
ESHA	$7,5 \pm 0,5$	$2,7 \pm 0,1$	5180

Tabela 6. Neki relativni intenziteti linija ATR-FTIR spektara (u odnosu na intenzitet C=C aromatične linije na  $1520 \text{ cm}^{-1}$ ) i indeks aromatičnosti huminskih kiselina TCHA, LPHA, i standarda ESHA (merna nesigurnost <5%) (*Radmanović i sar., 2020*)

Uzorak HA	$I_{3273}$	$I_{2923}$	$I_{1705}$	$I_{1620}$	$I_{1080}$	$I_{1030}$	$I_{1620}/I_{2920}$
TCHA	0,65	0,18	1,00	1,40	0,67	0,66	2,42
LPHA	0,88	0,18	1,26	1,52	0,83	0,88	2,08
ESHA	0,90	0,11	1,35	1,74	0,86	0,91	4,24

Tabela 7. Veličina čestica (PS) i zeta potencijal (ZP) huminskih kiselina TCHA, LPHA, i standarda ESHA ( $0,02 \text{ g dm}^{-3}$ ) (*Radmanović i sar., 2020*)

Uzorak HA	pH 10		pH 3	
	PS <sup>a</sup>	ZP	PS <sup>a</sup>	ZP
	nm	mV	nm	mV
TCHA	15,0	$-31,9 \pm 1,4$	3284	$-19,4 \pm 1,3$
LPHA*	74,7	$-29,8 \pm 2,4$	893	$-20,1 \pm 0,7$
ESHA	10,2	$-18,5 \pm 4,7$	4658	$-16,9 \pm 2,0$

\* Rezultati dobijeni u ovom radu;

<sup>a</sup> Merna nesigurnost < 6%.

## 7.2. Priprema uzoraka huminskih kiselina za analizu

Osnovne suspenzije huminskih kiselina TCHA, LPHA i ESHA koncentracije  $2 \text{ g dm}^{-3}$  su pripremljene u  $0,01 \text{ M KOH}$  i čuvane na temperaturi od  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ . Pre svake titracije pripremana je suspenzija huminske kiseline koncentracije  $0,8 \text{ g dm}^{-3}$ , tako što su osnovna suspenzija i  $0,1 \text{ M KNO}_3$  pomešane u odnosu 1:1,5. Tako pripremljenoj suspenziji podešena je zadata pH vrednost.

## 7.3. Priprema rastvora $\text{As}^{3+}$

U slučaju trovalentnog arsena, neutralne vrste  $\text{As}(\text{OH})_3$  i  $\text{HAsO}_2$  dominiraju pri  $\text{pH} \leq 9$ , jednovalentne anjonske vrste  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  i  $\text{AsO}_2^-$  zastupljene su u opsegu pH od 9 do 11, dok su dvovalentni joni  $\text{AsO}_2\text{OH}^{2-}$  prisutni pri  $\text{pH} > 11$  (Warwick i sar., 2005).

Za pripremu rastvora trovalentnog arsena korišćen je natrijum-meta-arsenit ( $\text{NaAsO}_2$ , Merck), koji je, kao i suspenzije huminskih kiselina, pripremljen u  $0,1 \text{ M KNO}_3$ . Na osnovu preliminarnih ispitivanja utvrđeno je da se najbolji ITC rezultati dobijaju pri titraciji HA sa rastvorom  $\text{As}^{3+}$  koncentracije  $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ .

## 7.4. Merenje toplote interakcije izotermalnom titracionom kalorimetrijom

U toku ITC titracije, titrant se u suspenziju HA dodaje u određenim delovima zapremine u zadatim vremenskim intervalima i snima promena snage koju kalorimetar generiše ili apsorbuje u toku vremena, pri čemu se dobija karakteristični termogram. Termogram predstavlja promenu toplote u vremenu izvođenja titracije. Pozitivne orijentacije dobijenih pikova ukazuju na reakcije kod kojih dolazi do oslobađanja toplote (egzotermne,  $\Delta H < 0$ ), dok se negativne odnose na reakcije sa apsorpcijom toplote (endotermne,  $\Delta H > 0$ ).

Provera validnosti rezultata dobijenih pri ITC eksperimentima izvršena je titracijom  $0,2 \text{ M}$  rastvora tri(hidroksimetil)metilamina (TRIS) rastvorom  $0,0409 \text{ M HCl}$ . Dobijena vrednost promene entalpije protonovanja TRIS-a ( $-44,36 \text{ kJ mol}^{-1}$ ) u skladu je sa literaturnom vrednošću ( $-46,67 \text{ kJ mol}^{-1}$ ), sa odstupanjem od oko 5 % (Marković i Milonjić, 1992).

Ispitivanje je izvršeno po sledećoj metodi: u reakcionim sudovima titracione ćelije odmeri se  $2,5 \text{ cm}^{-3}$  suspenzije huminske kiseline pripremljene za titraciju. Sud se postavlja u titracionu ćeliju (brzina mešanja  $120 \text{ min}^{-1}$ ). Pre spuštanja u radni položaj mernog cilindra, titraciona ćelija se uravnotežava spuštanjem u četiri stupnja. Radna temperatura za sve cikluse merenja je  $298,15 \text{ K}$ . Posle postizanja stabilne bazne linije, izvodi se titracija automatskom biretom.

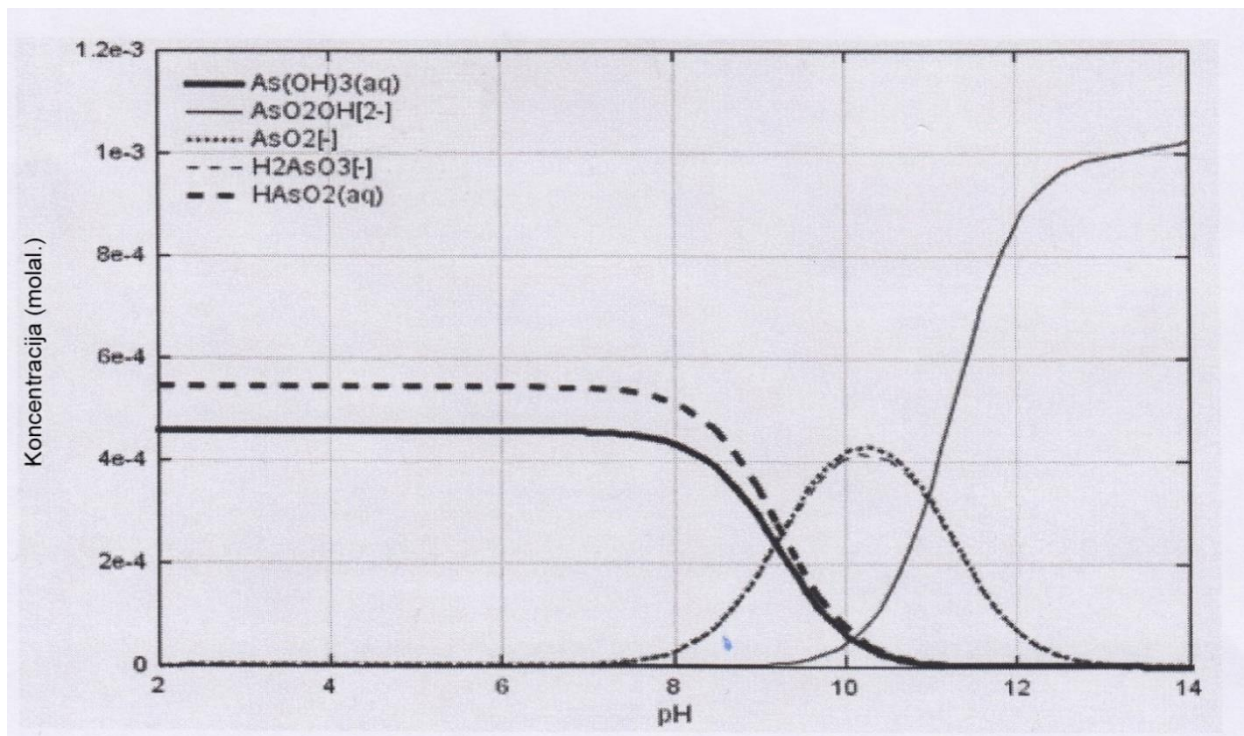
Na osnovu preliminarnih merenja zaključeno je da se najbolji rezultati dobijaju dodavanjem rastvora  $\text{As}^{3+}$  u porcijama od  $30 \text{ mm}^3$  na svakih 30 min, pri početnoj pH vrednosti suspenzije huminskih kiselina jednakoj 5, i brzini dodavanja rastvora  $\text{As}^{3+}$  od  $50 \text{ mm}^3 \text{ min}^{-1}$ . Toplotni efekti se za svaki titracioni korak kontinualno snimaju u vidu zavisnosti promene generisane snage ( $\mu\text{W}$ ) od vremena (min), koja predstavlja karakterističan termogram.

Računarski program za upravljanje radom automatske birete i akviziju podataka, kao i program za određivanje površina pikova na termogramu, razvijeni su u Laboratoriji za hemijsku dinamiku i permanentno obrazovanje Instituta za nuklearne nauke „Vinča“.

### 7.5. Teorijski model i termodinamička analiza

U dosadašnjem modelovanju ITC eksperimentalnih rezultata ispitivanja interakcije huminskih kiselina i različitih jedinjenja korišćeni su sledeći matematički modeli: model fitovanja jednačinom najmanjih kvadrata za jednu vrstu vezivanja (*Turkeova i sar., 2015B*); model višestrukih nereagujućih mesta (MNIS) (*Loosli i sar., 2015*), i model neidealne kompetitivne adsorpcije (NICA) (*Xu i sar., 2018*).

Trovalentni arsen se u vodenim rastvorima nalazi u obliku pet hemijskih vrsta (slika 28): neutralne vrste  $\text{As}(\text{OH})_3$  i  $\text{HAsO}_2$  preovlađuju do oko pH 9, jednom naelektrisanе anjonske vrste  $\text{H}_2\text{AsO}_3^-$  i  $\text{AsO}_2^-$  su zastupljene između pH 9 i 11, dok iznad pH 11 dominira dvostruko naelektrisanі anjon  $\text{AsO}_2\text{OH}^{2-}$  (*Warwick i sar., 2005*).



Slika 28. Zastupljenost vrsta  $\text{As}^{3+}$  u zavisnosti od pH vrednosti rastvora (*Warwick i sar., 2005*).

Kako pH u reakciji  $\text{As}^{3+}$  sa huminskim kiselinama u toku titracionih eksperimenata ne prelazi vrednost 9, može se zaključiti da su u rastvoru prisutne samo neutralne vrste  $\text{As}(\text{OH})_3$  i



HAsO<sub>2</sub>. Imajući navedeno u vidu, za opisivanje eksperimentalnih rezultata interakcije As<sup>3+</sup> i huminskih kiselina izabran je MNIS model. NICA model se odnosi na vezivanje jonskih vrsta i kao takav nije primenljiv na eksperimente ispitivanja interakcije As<sup>3+</sup> i huminskih kiselina.

Međutim, da bi se primenio MNIS model, neophodno je izvršiti dodatne eksperimente merenja pH vrednosti za svaki stupanj titracije. Eksperimenti pH-metrijske titracije su izvršeni van TAM-a, u uslovima identičnim onim pod kojim su izvedena ITC merenja.

Na eksperimentalnu zavisnost promene toplote po molu titranta ( $dQ/dn_L$ ) u funkciji odnosa molarnog naelektrisanja ( $Z = [L]/[M] = [As]_m/[HA]_m$ ) primenjen je MNIS model (*Courtois i Berret, 2010*).

Podešavanja parametara izvršeno je primenom jednačine MNIS modela (6):

$$\frac{dQ}{dn_L}(Z) = \frac{1}{2} \Delta H_b \left[ 1 + \left( 1 - \frac{[L]}{n[M]} - \frac{1}{nK_b[M]} \right) \left( \left( 1 + \frac{[L]}{n[M]} + \frac{1}{nK_b[M]} \right)^2 - \frac{4[L]}{n[M]} \right)^{-\frac{1}{2}} \right] \quad (6)$$

gde su parametri fitovanja: entalpija vezivanja  $\Delta H_b$  [kJ mol<sup>-1</sup>], konstanta afiniteta vezivanja  $K_b$  [M<sup>-1</sup>] i stehiometrija reakcije  $n$ . Vrednosti ovih parametara podešavane su tako da se eksperimentalni rezultati najbolje tumače ovim modelom, odnosno da su odstupanja minimizirana.

Prema dijagramu na slici 28, odnos koncentracija neutralnih vrsta je konstantan u opsegu pH vrednosti tokom reakcije, sa udelima: As(OH)<sub>3</sub> = 0,46 i HAsO<sub>2</sub> = 0,54, i pod pretpostavkom da se aktuelne vrste vežu vodoničnim vezama, koncentracija u molovima naelektrisanja po jedinici zapremine  $[As]_m$ , izražava se jednačinom (7):

$$[As]_m = 1,92 [As]_M \quad (7)$$

gde je  $[As]_M$  - molarna koncentracija As<sup>3+</sup>.

Koncentracija u molovima naelektrisanja po jedinici zapremine za huminsku kiselinu,  $[HA]_m$ , data je jednačinom (8) (*Loosli i sar., 2015*):

$$[HA]_m = [HA]_M Q_{tot} 10^{-3} C\% / 100 \quad (8)$$

gde su:  $[HA]_M$  - molarna koncentracija huminske kiseline,  $Q_{tot}$  - ukupna gustina naelektrisanja huminske kiseline [meq gC<sup>-1</sup>] i C% - procenat ugljenika u huminskoj kiselini.

Veličina  $Q_{tot}$  data je modifikovanom Henderson-Hasselbalch-ovom jednačinom (9):

$$Q_{tot} = (Q_1 / (1 + (K_1 [H])^{1/n_1})) + (Q_2 / (1 + (K_2 [H])^{1/n_2})) \quad (9)$$

Vrednosti maksimalnih gustina naelektrisanja karboksilnih i fenolnih funkcionalnih grupa,  $Q_1$  i  $Q_2$ , konstante disocijacije ovih grupa,  $K_1$  i  $K_2$ , i empirijski parametri  $n_1$  i  $n_2$  preuzeti su iz *Ritchie i Perdue (2003)*.

Dobijene vrednosti konstante afiniteta vezivanja i entalpije vezivanja su omogućile izračunavanje promene Gibbs-ove slobodne energije,  $\Delta G_b$  [ $\text{kJ mol}^{-1}$ ] koristeći jed. (2), i promene entropije,  $\Delta S_b$  [ $\text{kJ K}^{-1} \text{mol}^{-1}$ ], koristeći jed. (10):

$$\Delta S_b = (\Delta H_b - \Delta G_b) / T \quad (10)$$

## 7.6. Merenje zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica

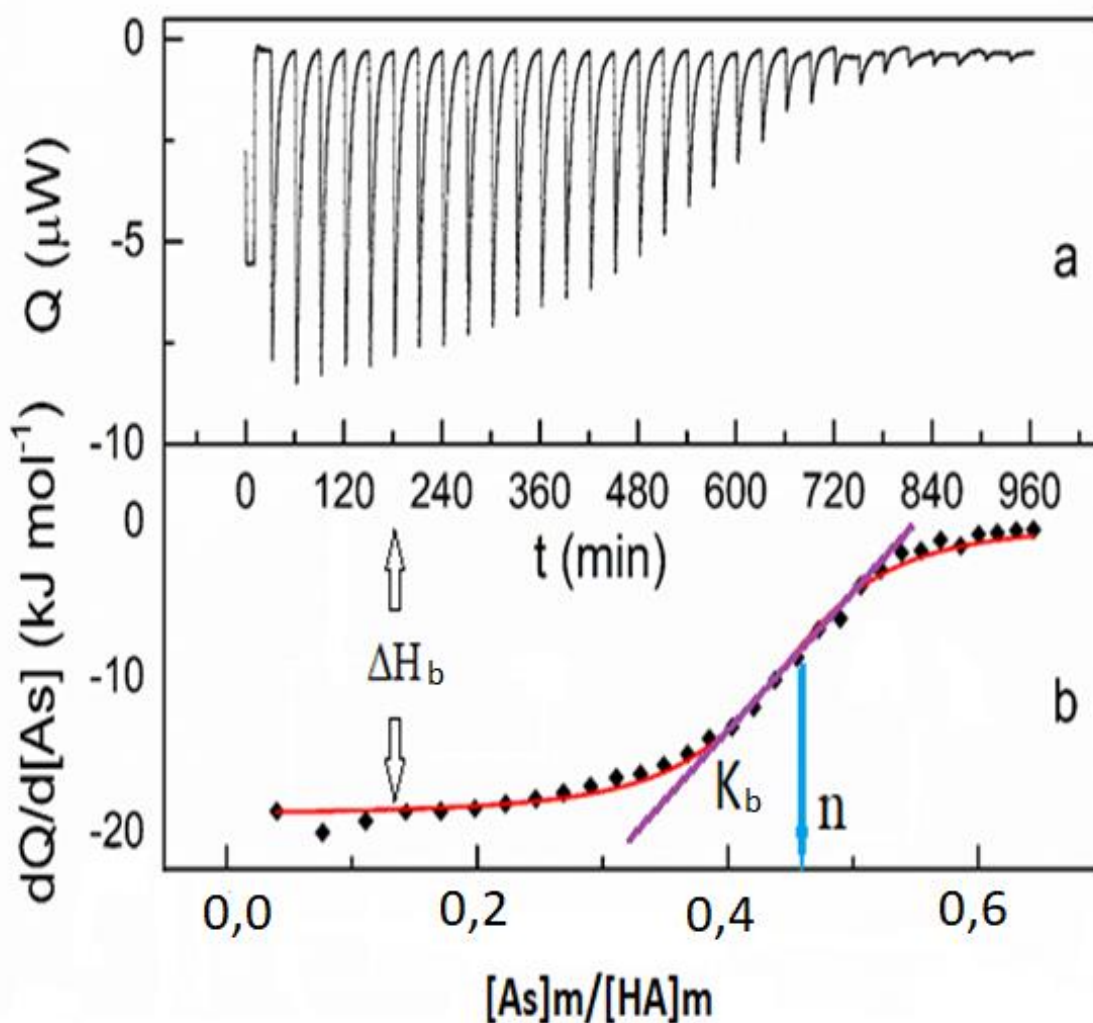
Pod identičnim uslovima kao kod ITC eksperimenata, izvedeni su eksperimenti merenja zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica pri svakom dodavanju inkrementa zapremine rastvora  $\text{As}^{3+}$  u suspenziju huminske kiseline. Dobijeni rezultati su grafički prikazani kao zavisnost srednjeg dinamičkog prečnika čestica i zeta potencijala u funkciji odnosa molarnog naelektrisanja ( $[\text{As}]_m/[\text{HA}]_m$ ).

Takođe, izvršena su merenja zeta potencijala rastvora  $\text{As}^{3+}$  ( $5 \text{ mmol dm}^{-3}$ ), kao i zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika suspenzija huminskih kiselina (TCHA, LPHA i ESHA koncentracije  $0,8 \text{ g dm}^{-3}$ ) u funkciji pH vrednosti.

## 8. REZULTATI I DISKUSIJA

### 8.1. Termodinamika interakcije arsenita i huminskih kiselina

Grafički prikaz određivanja termodinamičkih parametara primenom MNIS matematičkog modela prdstavljen je na slici 29.



Slika 29. Grafički prikaz određivanja termodinamičkih parametara primenom MNIS matematičkog modela

Eksperimentalni rezultati dobijeni u obliku termograma prikazani su na slici 29a. Generisane toplote ( $dQ$ ) po svakoj dodatoj količini arsenita ( $dAs^{3+}$ ) jednake su površini ispod pri tome nastalog pika. Kada se ove veličine predstave u zavisnosti od odnosa molarnih naelektrisanja, za svako od dodavanja, dobije se rezultat prikazan punim crnim kvadratićima ( $\blacklozen$ ) (slika 29b). Primenom MNIS matematičkog modela (jednačina 6) na dobijene rezultate dobija se S-kriva prikazana crvenom linijom. Rastojanje između donjeg i gornjeg platoa S-krive, po osi  $dQ/dAs^{3+}$ , jednako je promeni entalpije vezivanja arsenita i huminskih kiselina ( $\Delta H_b$ ). Nagib prave u prevojnoj tački S-krive jednak je konstanti reakcije vezivanja ( $K_b$ ), a projekcija prevojne tačke na  $[As]_m/[HA]_m$  osu daje stehiometrijski odnos arsenita i huminske kiseline u nastalom kompleksu  $As^{3+} - HA$ .

Termogrami generisani ITC merenjima ilustrovani su na slikama 30a–32a. Integraljeni pikovi na termogramu, koji odgovaraju promeni toplote reakcije pri svakoj dodatoj količini rastvora  $As^{3+}$  ( $dQ/d[As]$ ), u funkciji odnosa molarnih naelektrisanja ( $[As]_m/[HA]_m$ ), prikazani punim crnim kvadratićima ( $\blacksquare$ ) ili ( $\blacklozen$ ), ilustrovani su na slikama 30b–32b. Primena MNIS modela na eksperimentalne podatke prikazana je punom linijom crvene boje ( $\text{—}$ ). Dobijene vrednosti koeficijenta korelacije  $R^2$ , u opsegu od 0,996 do 0,936, ukazuju da se MNIS model može uspešno koristiti za predstavljanje procesa interakcije  $As^{3+}$  i huminskih kiselina. Tabele proračuna primene MNIS modela za TCHA, LPHA i ESHA date su u priložima 1, 2 i 3, respektivno. Kao rezultat primene MNIS modela, dobijene su vrednosti promene entalpije vezivanja ( $\Delta H_b$ ), konstante vezivanja ( $K_b$ ) i stehiometrija reakcije ( $n$ ), koje su sumirane u tabeli 8. Takođe, u istoj tabeli predstavljene su i izračunate vrednosti promene Gibbs-ove slobodne energije ( $\Delta G_b$ ) i promene entropije ( $\Delta S_b$ ).

Tabela 8. Vrednosti  $\Delta H_b$ ,  $K_b$  i  $n$  dobijene kao parametri podešavanja eksperimentalnih ITC podataka MNIS modelom, i izračunate  $\Delta G_b$  i  $\Delta S_b$  vrednosti.

	TCHA	LPHA	ESHA
$\Delta H_b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	- (15,64 ± 0,36)	- (16,24 ± 0,26)	- (18,96 ± 0,19)
$K_b$ 10 <sup>5</sup> (M <sup>-1</sup> )	7,57 ± 2,12	5,02 ± 0,84	5,36 ± 0,51
$n$	0,586 ± 0,006	0,694 ± 0,006	0,498 ± 0,002
$R^2$	0,936	0,980	0,996
$\Delta G_b$ (kJ mol <sup>-1</sup> )	-27,85	- 26,83	- 27,00
$\Delta S_b$ (kJ mol <sup>-1</sup> K <sup>-1</sup> )	0,041	0,035	0,027

Posmatranjem termograma prikazanim na slikama 30a–32a može se uočiti da intenziteti pikova postepeno opadaju sa vremenskim napredovanjem titracije. Ova tendencija je očekivana i uzrokovana je interakcijom između  $As^{3+}$  i HA, jer arsenit u toku titracije progresivno zauzima sve veći broj slobodnih aktivnih mesta huminskih kiselina, što dovodi do smanjenja visine i površine pikova, a samim tim i toplote vezivanja. Termohemijska reakcija se može smatrati završenom kada visina pikova dostigne nivo fona, odnosno bazne linije.

Negativni pikovi na ITC termogramima ukazuju na oslobađanje toplote prilikom interakcije  $As^{3+}$  i HA, što kao rezultat daje negativne vrednosti promene entalpije, tako da se može smatrati da je reakcija vezivanja  $As^{3+}$  i HA egzoterman proces.

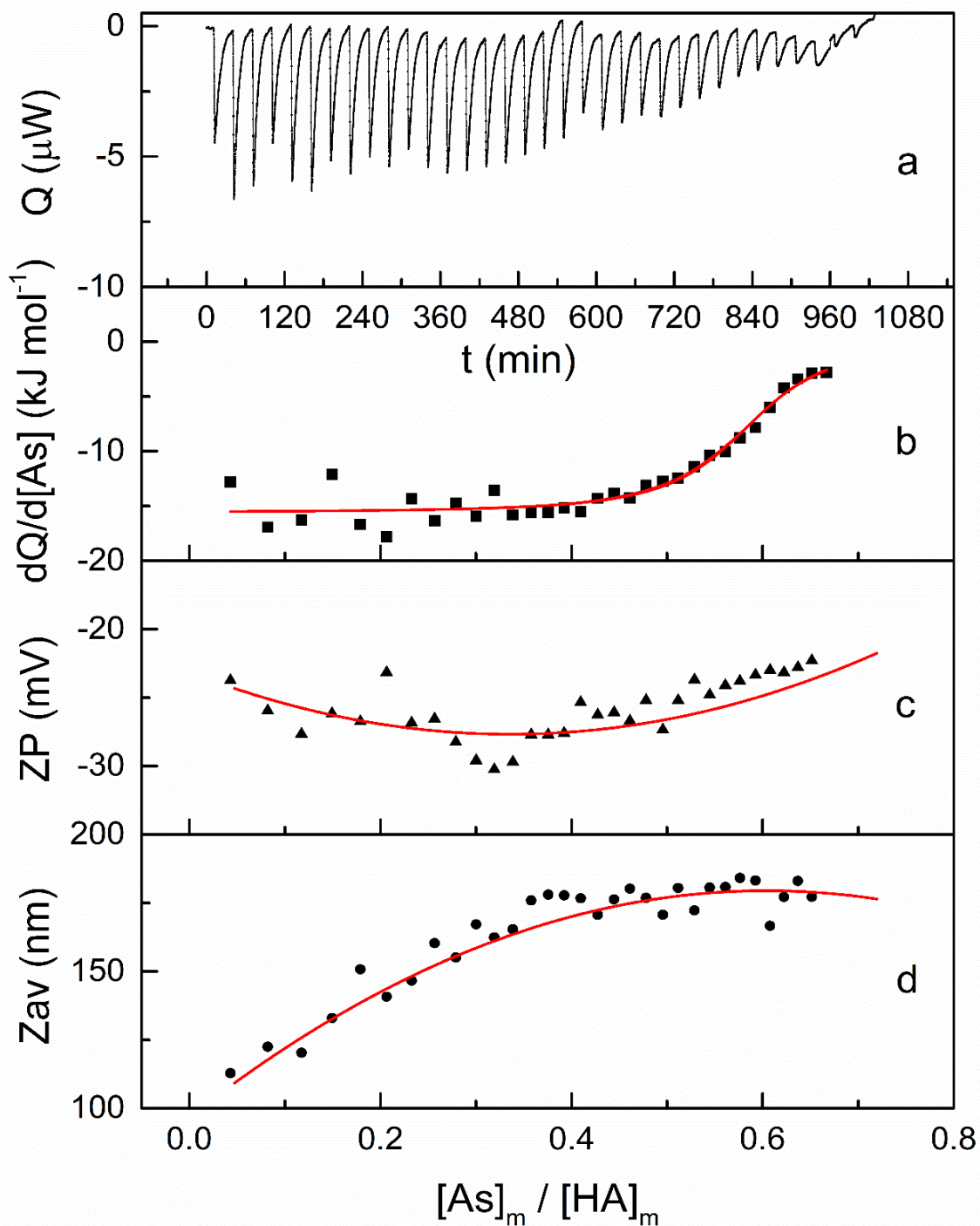
Što se tiče negativnih vrednosti promene Gibbs-ove slobodne energije, može se zaključiti da je interakcija spontana i dovodi do formiranja kompleksa  $\text{As}^{3+}$ - HA.

Vrednosti konstante vezivanja jasno ukazuju na afinitet ka vezivanju.

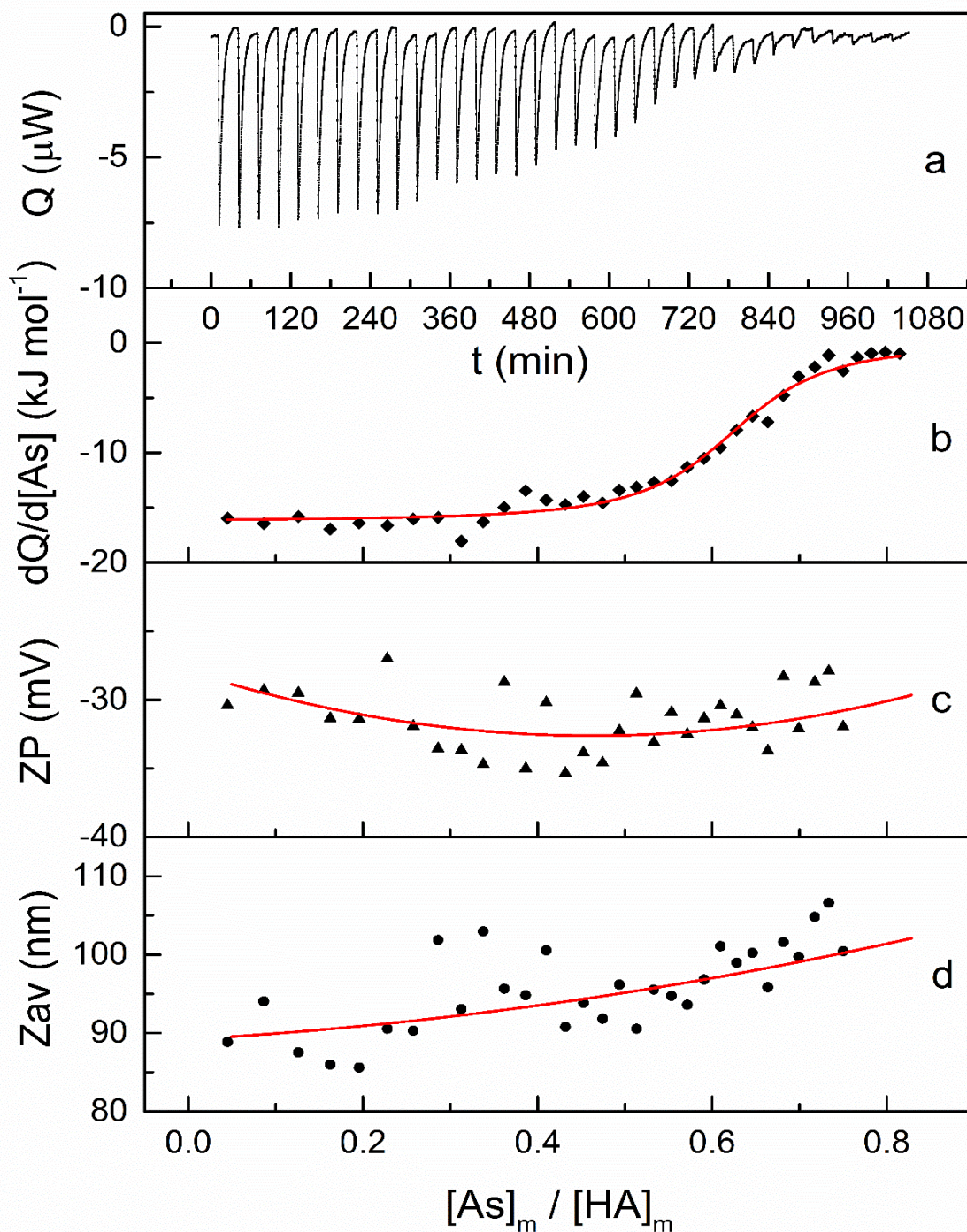
Kako su  $\Delta S$  vrednosti očigledno pozitivne, ali blizu nule, i  $\Delta H > \Delta S$ , reakcija se može smatrati entalpijski vođenom, tj. favorizovanom.

Kao što je već pomenuto, ne postoje literaturni podaci za termodinamičke parametre interakcije  $\text{As}^{3+}$  i HA, tako da nije moguće izvršiti poređenje sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

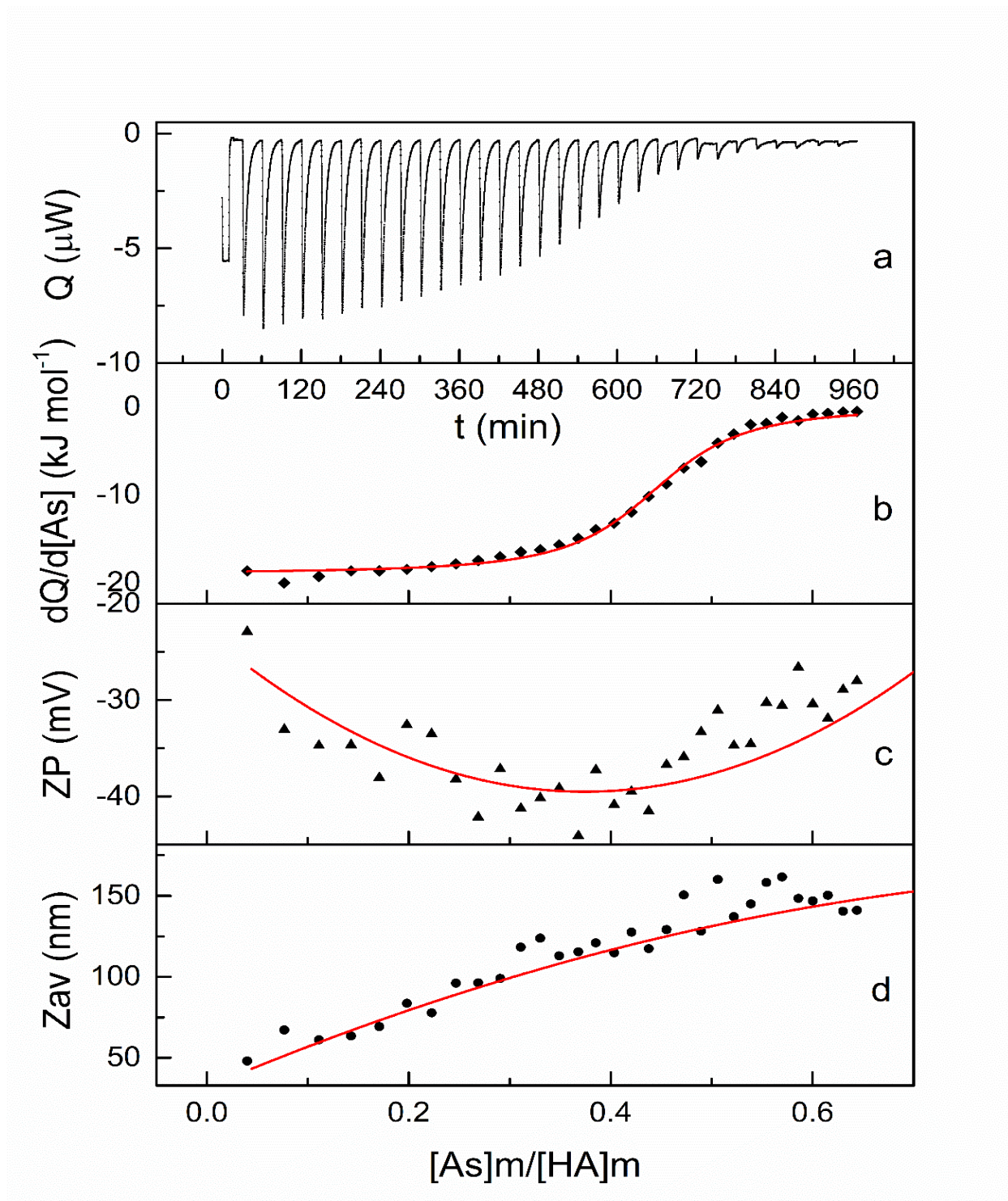
*Martin i sar. (2009)* su jedini autori koji su, koristeći ITC, ispitivali sistem koji sadrži arsenit i HA, ali su pratili uticaj HA na adsorpciju arsenita u sistemu kaolinit-ferihidrit. Dobijeni termodinamički parametri ukazuju da se vezivanje arsenita samo neznatno smanjuje u prisustvu huminske kiseline usled blokiranja adsorpcionih centara ligandima HA, kao i prostornim blokiranjem arsenita velikim organskim molekulima.



Slika 30. (a) ITC termogram, (b) integrisani podaci promene toplote po dodatom As ( $dQ/d[As]$ ) – (■) i MNIS model – (—), (c) zeta potencijal (ZP) i (d) srednji hidrodinamički prečnik (Zav) kao funkcija odnosa molarnih naelektrisanja ( $[As]_m/[HA]_m$ ), za TCHA.



Slika 31. (a) ITC termogrammi, (b) integrirani podaci promene toploti po dodatom As ( $dQ/d[As]$ ) – ( $\blacklozenge$ ) i MNIS model – ( $\text{—}$ ), (c) zeta potencijal (ZP) i (d) srednji hidrodinamički prečnik ( $Zav$ ) kao funkcija odnosa molarnih naelektrisanja ( $[As]_m/[HA]_m$ ), za LPHA.

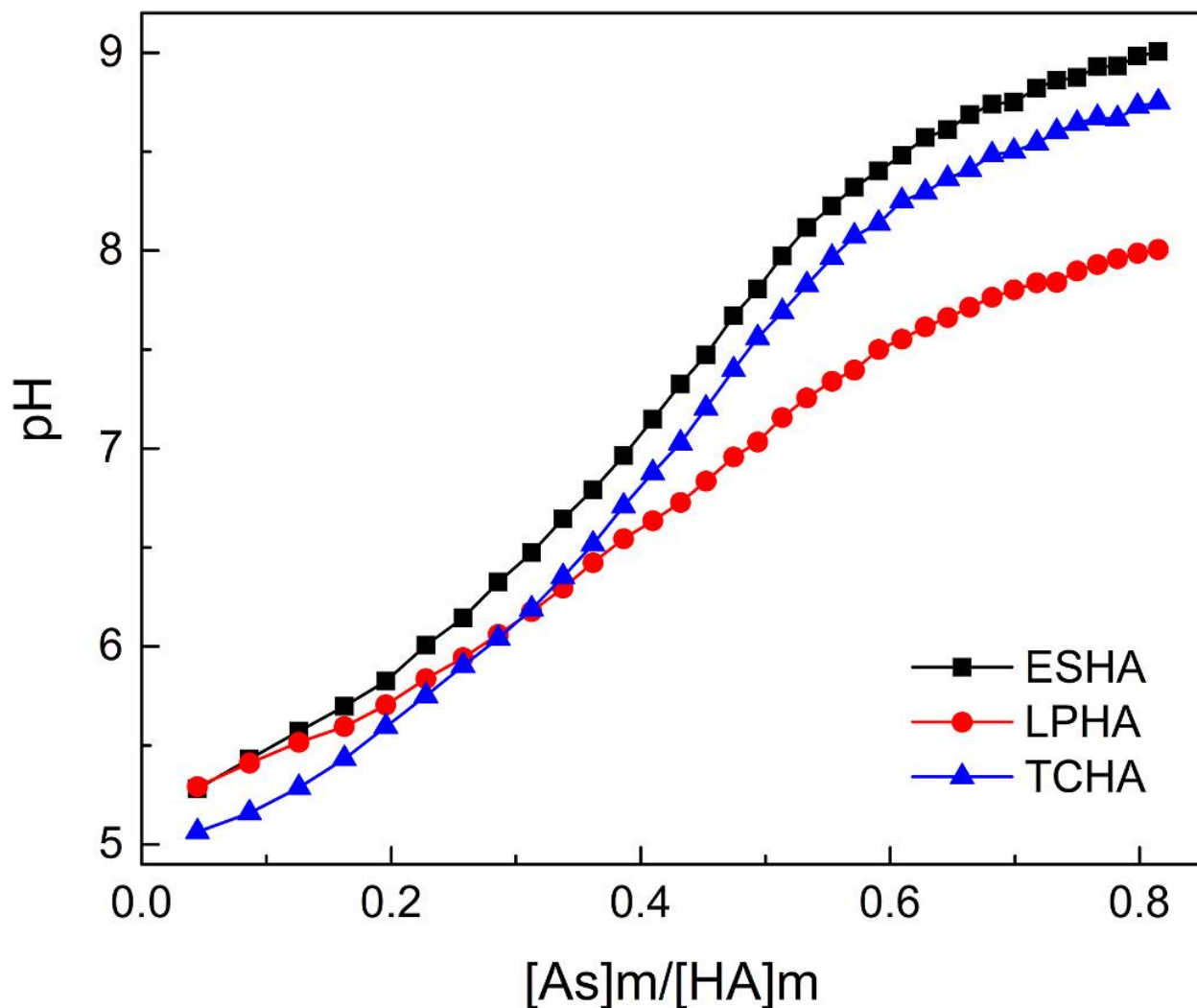


Slika 32 (a) ITC termogram, (b) integrirani podaci promene toplote po dodatom As ( $dQ/d[As]$ ) – (♦) i MNIS model – (—), (c) zeta potencijal (ZP) i (d) srednji hidrodinamički prečnik ( $Z_{av}$ ) kao funkcija odnosa molarnih naelektrisanja ( $[As]_m/[HA]_m$ ), za ESHA



Mnoge studije se bave određivanjem termodinamičkih i reakcionih parametara vezivanja različitih liganada za HA koristeći ITC tehniku pod različitim eksperimentalni uslovima (temperatura, koncentracija, pH). Tako, u poređenju sa entalpijski vođenim procesom vezivanja arsenita i huminske kiseline, entropijski vođena interakcija  $\text{TiO}_2$ -HA ima manje negativnu promenu entalpije, sličnu vrednost konstante vezivanja i višu reakcionu stehiometriju, kao i neznatno negativniju promenu Gibbs-ove slobodne energije i veću pozitivnu promenu entropije (*Loosli i sar., 2015*). Iako su podaci dobijeni u ovoj disertaciji i u radu *Loosli-ja i sar. (2015)* uspešno opisani korišćenjem MNIS modela, ove razlike su verovatno prouzrokovane specifičnim interakcijama vezivanja. Naime, ispod izoelektrične tačke  $\text{TiO}_2$ , sugeriše se da mehanizmi stvaranja tzv. mostova i zakrpa igraju važnu ulogu u toku interakcije. Nasuprot tome, van der Waals-ove interakcije su prisutne iznad izoelektrične tačke.

U ovoj disertaciji, vrednost pH pripremljenih huminskih kiselina na početku titracije bila je 5, ne prelazeći 8 za LPHA i 9 za ESHA i TCHA na kraju titracije (slika 33). Posmatranjem promene pH sa odnosom molarnih naelektrisanja arsenita i huminskih kiselina, evidentno je da se do vrednosti odnosa od oko 0,4 zavisnosti za ESHA, LPHA i TCHA neznatno razlikuju. Pri odnosima većim od 0,4, krive se razdvajaju, pri čemu je očigledno da se zavisnost za LPHA značajno razlikuje u odnosu na TCHA i ESHA. Ovo je još jedna potvrda o značajnijem vezivanju arsenita od strane LPHA u odnosu na TCHA i ESHA.



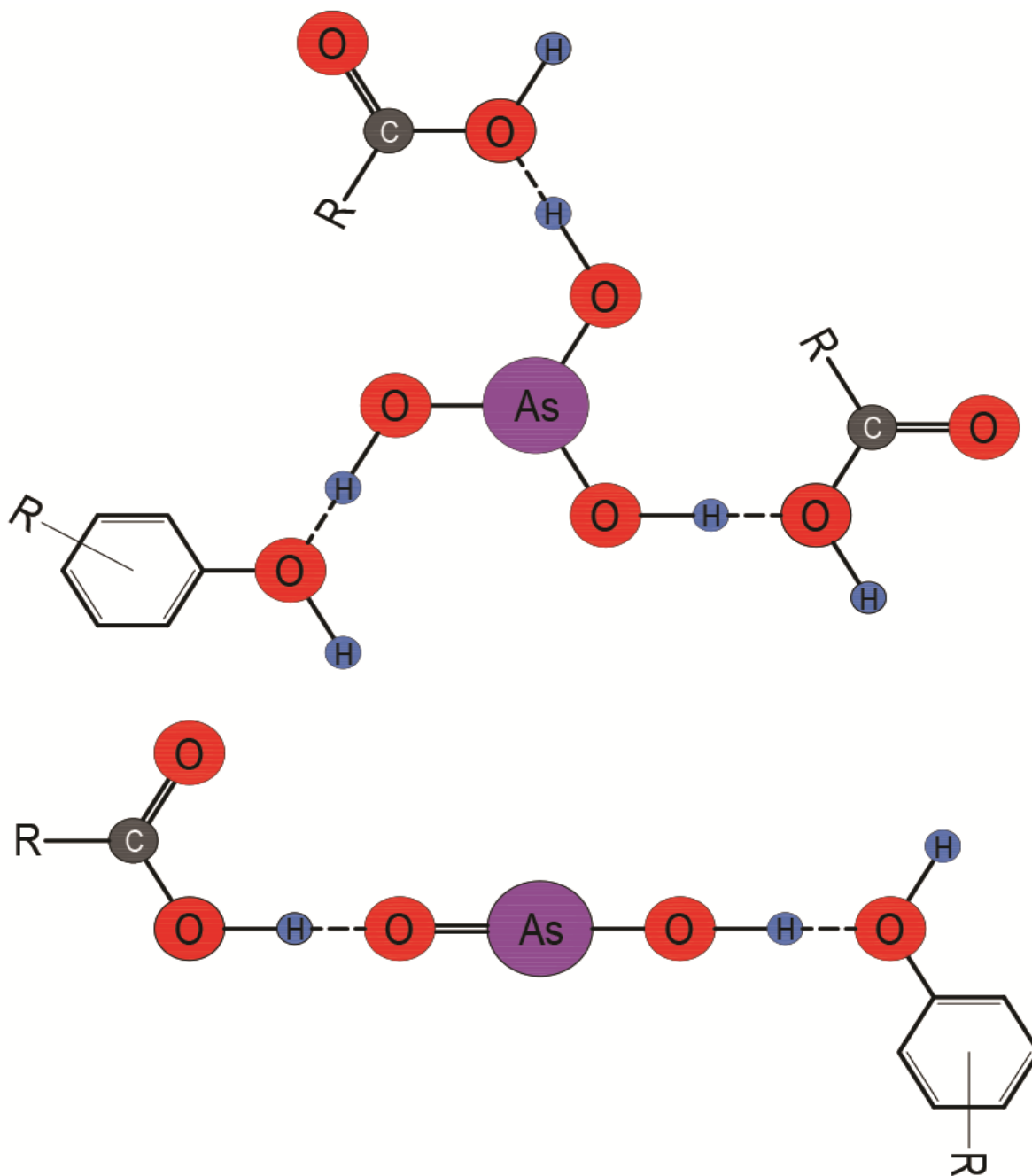
Slika 33. Promena pH vrednosti sa promenom odnosa molarnih naelektrisanja u toku titracije

Pošto  $\text{As}^{3+}$  formira stabilne neutralne hidroksokomplekse ( $\text{As}(\text{OH})_3$  i  $\text{HAsO}_2$ ) pri pH ispod 8 (Warwick *i sar.*, 2005), ove hemijske vrste su jedine prisutne u rastvoru uzorka do kraja titracije. Pri pH vrednostima iznad 8, postoji mogućnost formiranja anjona  $\text{AsO}_2^-$  i vezivanje reakcijom jonske izmene, uzrokujući da se MNIS model ne može primeniti na podatke dobijene u ovom pH opsegu. Međutim, iznad opsega stehiometrije reakcije ( $n = 0,694-0,498$ ), kada se titracija može smatrati završenom, očigledno je da MNIS model i dalje uspešno prati dobijene eksperimentalne tačke (slike 30b–32b), sugerišući vodonične veze kao dominantan tip interakcije između arsenita i huminske kiseline.

Sa ciljem da se bolje upoznaju mehanizmi vezivanja arsenita i HA, različiti parametri interakcije određivani su pod različitim eksperimentalnim uslovima korišćenjem mnogih analitičkih tehnika. Prema Buschmann-*u i sar.* (2006), iako pH zavisnost koeficijenta raspodele arsenit-HA nije pokazala očigledan maksimum, vezivanje je bilo jače pri nižim pH vrednostima. Ovi autori su razmatrali i formiranje stabilnog kompleksa arsenita i fenolne grupe huminske kiseline reakcijom razmene liganda. U slučaju karboksilnih grupa kao slabijih elektronskih donora, reakcija razmene liganda se verovatno ne dešava. Nasuprot ovome, karboksilne grupe

mogu vezati arsenit formiranjem negativno naelektrisanog kompleksa, stabilizovanog vodoničnim mostovima (*Buschmann i sar., 2006; Ren i sar., 2017*). *Liu i Cai (2010)* su klasifikovali HA funkcionalne grupe kao jake i slabe centre vezivanja arsena putem različitih mehanizama. Oni su sugerisali da su jaka mesta centri vezivanja sa helatnim funkcionalnim grupama koje sa arsenitom mogu da formiraju bi-dentatne (ili multi-dentatne) komplekse. Nasuprot tome, slabi centri ne sadrže helatne grupe i formiraju samo monodentatne komplekse.

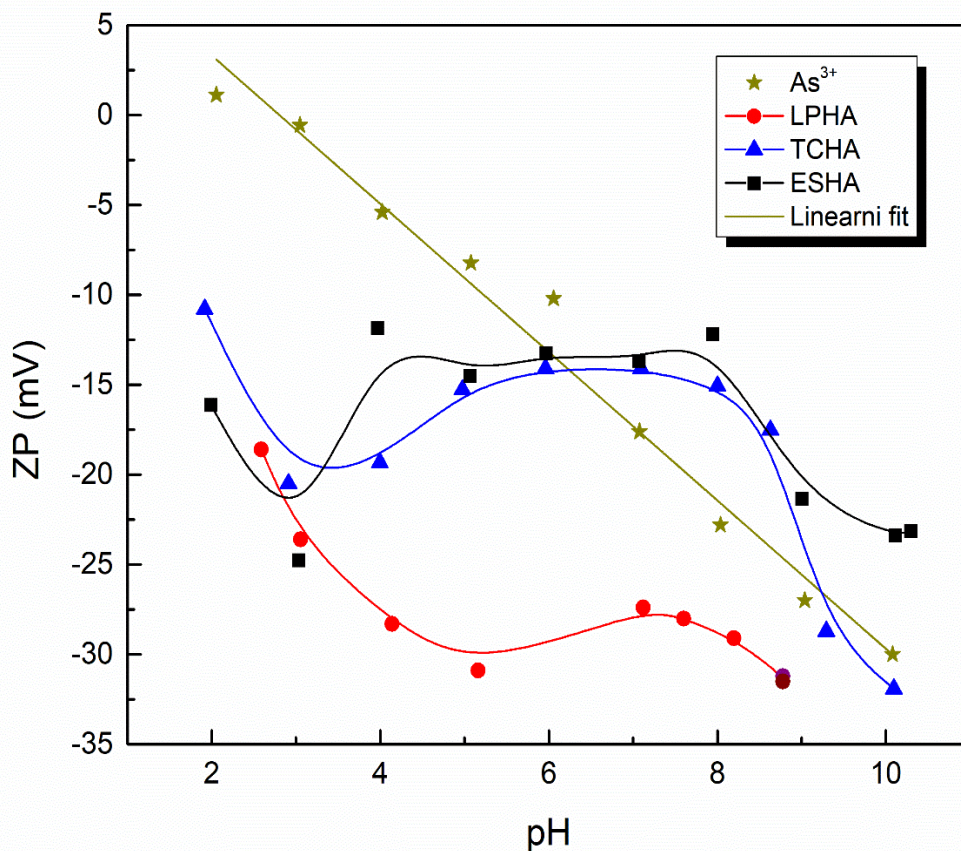
Prethodno objavljeni podaci nisu uključivali rezultate merenja toplota reakcija. Razmatrajući rezultate ove disertacije, reakcione toplote merene ITC tehnikom i vrednost  $\Delta H = - (18,96-15,64) \text{ kJ mol}^{-1}$  dobijene primenom MNIS modela, potvrđuju vodonične veze (tipična jačina veze od 10 do 40  $\text{kJ mol}^{-1}$ ) kao dominantan tip interakcije u kompleksu  $\text{As}^{3+}$ - HA za karboksilne i fenolne funkcionalne grupe. Šematski prikaz mogućih načina formiranja vodonične veze (---) prisutnih vrsta arsenita  $\text{As}(\text{OH})_3$  i  $\text{AsH}_2\text{O}_2$  sa karboksilnim i fenolnim funkcionalnim grupama dat je na slici 34. Pored toga, eksperimentalni stehiometrijski odnos (n), dobijen MNIS modelom, nalazi se u opsegu od 0,498 do 0,694, što je u saglasnosti sa vrednošću 0,69, teorijski izračunatom na osnovu odnosa vrsta  $\text{As}^{3+}$  i pretpostavljene vodonične veze.



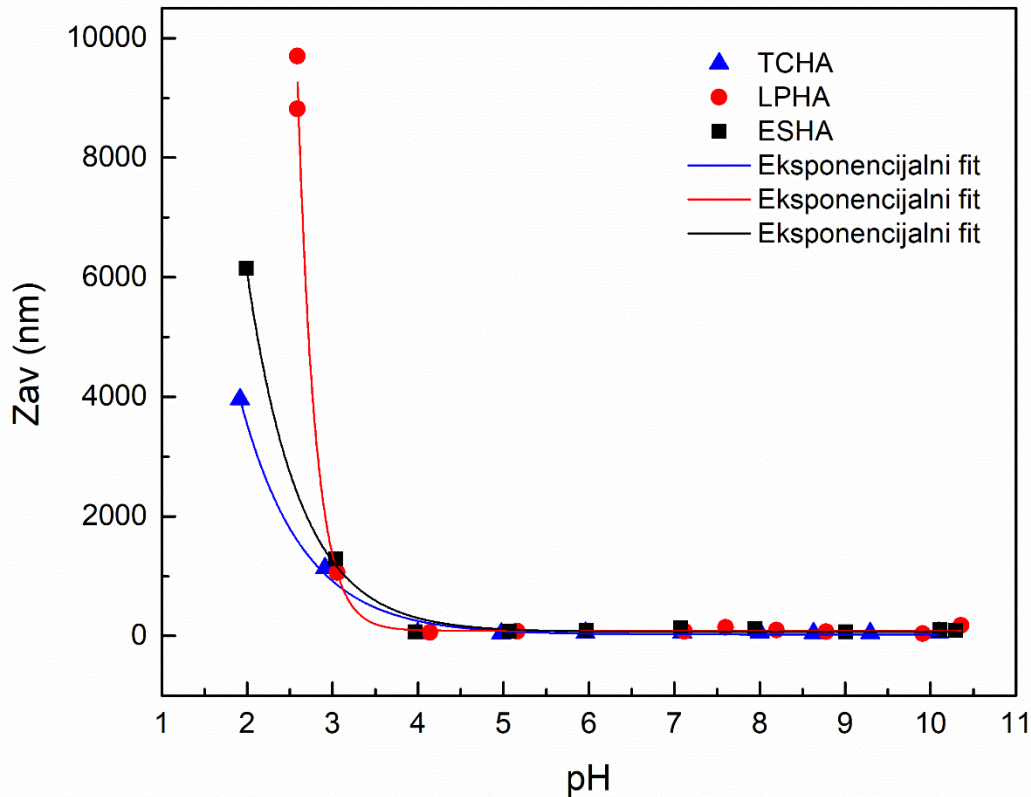
Slika 34. Šematski prikaz mogućih načina formiranja vodonične veze vrsta arsenita ( $\text{As}(\text{OH})_3$  - iznad,  $\text{HAsO}_2$  - ispod) sa karboksilnim i fenolnim funkcionalnim grupama huminske kiseline

## 8.2. Zeta potencijal rastvora $\text{As}^{3+}$ i zeta potencijal i srednji dinamički prečnik huminskih kiselina u zavisnosti od pH vrednosti

Kako pri ITC eksperimentima dolazi do značajne promene pH vrednosti (slika 33), prouzrokovane visokom pH vrednošću  $\text{As}^{3+}$  rastvora ( $\text{pH} = 10,08$ ), izvršeno je eksperimentalno određivanje zeta potencijala za rastvor  $\text{As}^{3+}$ , kao i zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica suspenzija huminskih kiselina u zavisnosti od pH vrednosti. Za ove eksperimente rastvor  $\text{As}^{3+}$  i suspenzije HA su pripremljeni identično kao i za ITC eksperimente. Rezultati ovih eksperimenata prikazani su na slikama 35 i 36.



Slika 35. Zeta potencijal u zavisnosti od pH vrednosti za rastvor  $\text{As}^{3+}$  i suspenzije TCHA, LPHA i ESHA.



Slika 36. Srednji dinamički prečnik čestica u zavisnosti od pH vrednosti za suspenzije TCHA, LPHA i ESHA

Na osnovu rezultata zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica prikazanih na slikama 35 i 36, očigledno je da se LPHA razlikuje od TCHA i ESHA. Vrednosti ZP za LPHA su izrazito negativnije u celom opsegu pH (-20 do -35 mV), dok se ZP vrednosti za TCHA i ESHA u intervalu pH od 2 do 9 nalaze u opsegu od -10 do -25 mV. Za razliku od zavisnosti zeta potencijala od pH, vrednost hidrodinamičkog prečnika za sve tri ispitivane huminske kiseline u opsegu pH od 4 do 10 bliska je nuli, odnosno agregacija nije uočena. Pri pH vrednostima ispod 3 evidentna je izražena agregacija, pri čemu se najveći agregati formiraju u slučaju LPHA (oko 10000 nm), a najmanji za TCHA (oko 4000 nm). Ove već ranije naglašene razlike su najverovatnije uslovljene različitim sadržajima funkcionalnih grupa. U tabeli 5 dati su sadržaji funkcionalnih grupa za LPHA i ESHA. Sadržaj funkcionalnih grupa za TCHA nije bilo moguće odrediti primenjenom metodom kiselinско-bazne titracije, najverovatnije zbog niskog sadržaja funkcionalnih grupa (Jovanović i sar., 2022).

Takođe, očigledno je da je vrednost stehiometrijskog odnosa ( $n$ ) arsenita i huminskih kiselina u kompleksu  $As^{3+}$ - HA najveća za LPHA (tabela 8). Neočekivano, stehiometrijski odnos za kompleks  $As^{3+}$ - TCHA je veći u odnosu na  $As^{3+}$ - ESHA, što je najverovatnije posledica

postojanja drugih vrsta interakcija pored pretpostavljene vodonične veze, kao što su, npr., Van der Waals-ove. Međutim, kao što se moglo očekivati, ispitivanje agregacije huminskih kiselina u funkciji pH vrednosti (slika 36) pokazuje da intenzitet agregacije opada od LPHA do TCHA, što je u skladu sa sadržajem funkcionalnih grupa (tabela 5).

### 8.3. Zeta potencijal i srednji hidrodinamički prečnik čestica kompleksa $As^{3+}$ - HA

Vrednosti zeta potencijala (ZP) i srednjeg hidrodinamičkog prečnika ( $Z_{av}$ ) u funkciji odnosa molarnih naelektrisanja ( $[As]_m/[HA]_m$ ) prikazani su na slikama 30c–32c i 30d–32d, respektivno. Negativne vrednosti ZP pokazale su da agregati arsenit-HA u celom opsegu odnosa molarnih naelektrisanja ostaju negativno naelektrisani (-45 do -20 mV). Ovo negativno naelektrisanje može biti prouzrokovano vodoničnim vezama kao dominantnim u formiranju agregata  $As^{3+}$ - HA, koje, nasuprot vezivanju metalnih katjona jonskom izmenom neutrališući HA funkcionalne grupe (Xu i sar., 2018), nisu promenile njihovo negativno naelektrisanje.

Promena veličine agregata je evidentna tokom titracije huminskih kiselina rastvorom arsenita, ali nije posebno izražena ( $Z_{av} = 50–180$  nm). Krive za ESHA i TCHA dostižu plato pri molarnom odnosu naelektrisanja  $\approx 0,6$ , dok se veličina agregata kod LPHA neznatno povećava bez platoa. Uzimajući sve u obzir, agregacija tokom procesa titracije je slabo izražena verovatno zbog odbojnih sila između negativno naelektrisanih čestica  $As^{3+}$ - HA kompleksa.

TCHA, LPHA i ESHA su izolovani iz zemljišta formiranih u različitim uslovima životne sredine. Uprkos njihovom različitom poreklu, dobijene vrednosti termodinamičkih, reakcionih i agregacionih parametara, dobijene u ovoj disertaciji, nalaze se u sličnom opsegu i sa istim trendom za sve ispitivane huminske kiseline.

### 8.4. Uticaj interakcije arsenita i huminskih kiselina na životnu sredinu

Usled izraženog prisustva toksičnih organskih i neorganskih vrsta arsena u životnoj sredini, njihova interakcija sa prirodnom organskom supstancom ima veliki značaj sa stanovišta zaštite životne sredine, i stoga je sveobuhvatno proučavana u literaturi. Tako, manja smrtnost mikroorganizama prisutnih u realnim vodenim sistemima (*Artemia salina*) izloženim  $As^{3+}$  i  $As^{5+}$  u prisustvu zemljišnih huminskih supstanci potvrđuje redukovanu mobilnost ovih toksičnih vrsta, što je od izuzetnog značaja za životnu sredinu. Ovaj rad potvrđuje postojanje interakcije arsena i huminskih supstanci, kao i značaj prirodne organske materije u kompleksiranju i smanjenju bioraspoloživosti ovih izuzetno toksičnih jedinjenja (Costa i sar., 2022). Povećana pokretljivost vrsta arsena može dovesti do njihovog prelaska iz zemljišta i sedimentata u zemljišni rastvor i podzemne vode, prouzrokujući njihovu kontaminaciju. Takođe, interakcije arsena i huminskih supstanci mogu biti korisne u procesima remedijacije zemljišta. Huminske kiseline kao frakcija prirodne organske supstance vezuju vrste arsena prisutne u zemljištu i sedimentima i tako utiču na povećanje njihove mobilnosti i oslobađanje u zemljišni rastvor. Qian i sar. (2022) su proučavali primenu i efekte huminskih i fulvo kiselina na migraciju arsena u jalovištima

kontaminiranim arsenom, i primenu ovih humusnih supstanci u tretmanu zemljišta kontaminiranih teškim metalima. Rezultati su pokazali da huminske i fulvo kiseline utiču na povećano otpuštanje arsena i pratećih metala (Ca, Fe, Al i Mn) iz jalovišta zagađenih ovim toksičnim jedinjenjima. *Li i sar. (2020)* su ispitivali uticaj huminskih i fulvo kiselina na povećanje efikasnosti remedijacije veštački kontaminiranih zemljišta. Rezultati primenjene elektrokinetičke remedijacije su ukazali na kompetitivnu adsorpciju, rastvaranje i kompleksiranje kao dominantne procese koji pospešuju otpuštanje arsena i povećavaju efikasnost remedijacije.

Razmatranjem napred izloženih literaturnih podataka i poređenjem sa rezultatima ove doktorske disertacije, očigledno je da termodinamički i reakcioni parametri vezivanja arsenita i huminskih kiselina dobijeni u ovom radu nedvosmisleno potvrđuju da se kompleksi  $As^{3+}$ - HA formiraju na pH vrednostima uobičajenim za zemljište, što ukazuje na evidentan uticaj huminskih kiselina na povećanu pokretljivost arsenita u zemljištu, a samim tim i na njegovu redukovanu bioraspoloživost.



## 9. ZAKLJUČAK

Prema literaturnim izvorima, interakcija arsena i huminskih kiselina proučavana je različitim eksperimentalnim tehnikama. ITC tehnika je korišćena samo za ispitivanje vezivanja arsenita i sistema ferihidrit-kaolinit u prisustvu huminske kiseline. Proces vezivanja arsena i huminskih kiselina u sistemu u kome su ovo jedine prisutne komponente do sada nije proučavan tehnikom ITC. Takođe, termodinamički i reakcioni parametri interakcije arsena i huminske kiseline, koji ukazuju na mehanizme vezivanja i strukturu formiranog kompleksa, nisu poznati u literaturi.

Na osnovu svega izloženog, mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Proces interakcije arsenita i tri ispitivane huminske kiseline proučavan je tehnikom izotermalne titracione kalorimetrije. Eksperimentalni podaci su uspešno interpretirani teorijskim MNIS modelom, što je omogućilo određivanje termodinamičkih i reakcionih parametara vezivanja.
- Negativne vrednosti entalpijskih promena ( $-(18,96-15,64)$  kJ mol<sup>-1</sup>) odredile su vezivanje arsenita i HA kao egzoterman proces. Negativne vrednosti promene Gibbs-ove slobodne energije ( $-(27,00-26,83)$  kJ mol<sup>-1</sup>) ukazale su na spontanost reakcije vezivanja, koja dovodi do formiranja kompleksa arsenita i huminske kiseline. Vrednosti konstante vezivanja ( $7,57-5,02$ ) 10<sup>5</sup> M<sup>-1</sup>) nedvosmisleno ukazuju na izražen afinitet vezivanja. Kako su vrednosti entropijske promene očigledno pozitivne, ali bliske nuli, i  $\Delta H > \Delta S$ , reakcija se može smatrati entalpijski vođenom.
- Teorijski MNIS model je primenjen na proces vezivanja arsenita i huminskih kiselina pod pretpostavkom da je vodonična veza dominantan tip interakcije u sistemu. Toplote reakcije merene tehnikom ITC i vrednosti  $\Delta H$  dobijene primenom MNIS modela potvrđuju da je vodonična veza zaista najzastupljenija vrsta interakcije u As<sup>3+</sup>-HA kompleksu, kako za karboksilne, tako i za fenolne grupe. Validnost ove pretpostavke potvrđena je vrednostima koeficijenta korelacije ( $R^2 = 0,996-0,936$ ) za primenu MNIS modela, kao i dobijenog stehiometrijskog odnosa ( $n = 0,498-0,694$ ), bliskog teorijskom za pretpostavljenu vezu.
- Proces agregacije huminskih kiselina u toku vezivanja arsenita i huminske kiseline praćen je tehnikama DLS i LDE. Negativne vrednosti zeta potencijala (-45 do -20 mV) pokazale su da agregati As<sup>3+</sup>-HA kompleksa ostaju negativno naelektrisani u celom opsegu odnosa molarnih naelektrisanja. Promena veličine agregata je evidentna, ali nije posebno izražena ( $Z_{av} = 50-180$  nm), što se možda može tumačiti odbojnim silama između negativno naelektrisanih čestica agregata As<sup>3+</sup>-HA.
- Na osnovu rezultata merenja zeta potencijala i srednjeg dinamičkog prečnika čestica ispitivanih huminskih kiselina u odsustvu arsenita, očigledno je da se LPHA razlikuje od TCHA i ESHA. U intervalu pH od 2 do 9 vrednosti ZP za LPHA su izrazito negativnije u celom opsegu pH (-20 do -35 mV), dok se ZP vrednosti za TCHA i ESHA u istom intervalu pH nalaze u opsegu od -10 do -25 mV.
- Vrednosti hidrodinamičkog prečnika za sve tri ispitivane huminske kiseline u opsegu pH od 4 do 10 bliske su nuli, odnosno agregacija nije uočena. Pri pH vrednostima ispod 3 evidentna je izražena agregacija, pri čemu se najveći agregati formiraju u slučaju LPHA (oko 10000 nm), a najmanji za TCHA (oko 4000 nm). Ove razlike su najverovatnije uslovljene različitim

sadržajima funkcionalnih grupa ispitivanih kiselina. Poređenjem ovih podataka sa rezultatima ispitivanja agregacionog procesa u toku titracije može se zaključiti da je odsustvo arsenita značajno uticalo na veličinu formiranih agregata, što je vrlo izraženo na niskim vrednostima pH.

- Termodinamički i reakcioni parametri dobijeni u ovom radu jasno ukazuju da se  $\text{As}^{3+}$ -HA kompleksi formiraju na pH vrednostima tipičnim za zemljište, što potvrđuje uticaj huminskih kiselina na povećanje mobilnosti i smanjenje biorasploživosti arsena.

Rezultati predstavljeni u ovoj disertaciji doprinose boljem poznavanju uticaja huminskih kiselina na mobilnost arsena u životnoj sredini i njegovu dostupnost živim organizmima, kao i na eventualne primene u procesima rekultivacije zagađenih područja.

## LITERATURA

- Arnold, C. G., Ciani, A., Müller, S. R., Amirbahman, A., Schwarzenbach, R. P. (1998) **Association of triorganotin compounds with dissolved humic acids**, Environmental Science & Technology 32, 2976–2983  
<https://doi.org/10.1021/es980114z>
- Avena, M. J., Wilkinson, K. J. (2002) **Disaggregation Kinetics of a Peat Humic Acid: Mechanism and pH Effects**, Environmental Science & Technology 36, 5100–5105  
DOI:[10.1021/es025582u](https://doi.org/10.1021/es025582u)
- Baalousha, M. (2009) **Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter**, Science of the Total Environment 407, 2093–2101  
[doi:10.1016/j.scitotenv.2008.11.022](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.022)
- Baker, H., Khalili, F. (2005) **A study of complexation thermodynamic of humic acid with cadmium (II) and zinc (II) by Schubert's ion-exchange method**, Analytica Chimica Acta 542, 240–248  
DOI:[10.1016/j.aca.2005.04.008](https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.04.008)
- Bissen, M., Frimmel, F. (2003) **Arsenic – a review. Part I. Occurrence, toxicity, speciation, mobility**, Acta Hydrochimica et Hydrobiologica 31 (1) 9–18  
<http://dx.doi.org/10.1002/aheh.200390025>
- Bryan, N. D., Hesketh, N., Livens, F. R., Tipping, E., Jones, M. N. (1998) **Metal ion-humic substance interaction: A thermodynamic study**, Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 94(1), 95–100  
<https://doi.org/10.1039/A705382G>
- Buschman, J., Kappler, A., Lindauer, U., Kistler, D., Berg, M., Sigg, L. (2006) **Arsenite and Arsenate Binding to Dissolved Humic Acids: Influence of pH, Type of Humic Acid, and Aluminum**, Environmental Science & Technology 40, 6015–6020  
DOI:[10.1021/es061057+y](https://doi.org/10.1021/es061057+y)
- Catrouillet, C., Davranche, M., Dia, A., Bouhnik-Le Coz, M., Pédrot, M., Marsac, R., Gruau, G. (2015) **Thiol groups controls on arsenite binding by organic matter: New experimental and modeling evidence**, Journal of Colloid and Interface Science 460, 310–320  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2015.08.045>
- Catrouillet, C., Davranche, M., Dia, A., Bouhnik-Le Coz, M., Demangeat, E., Gruau, G. (2016) **Does As<sup>3+</sup> interact with Fe(II), Fe(III) and organic matter through ternary complexes?**, Journal of Colloid and Interface Science, Elsevier 470, 153–161  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2016.02.047>
- Chianese, S., Fenti, A., Iovino, P., Musmarra, D., Salvestrini, S. (2020) **Sorption of Organic Pollutants by Humic Acids: A Review**, Molecules 25, 918  
doi: [10.3390/molecules25040918](https://doi.org/10.3390/molecules25040918)
- Chiou, C. T., Peters, L. J., Freed, V. H. (1979) **A Physical Concept of Soil-Water Equilibria for Nonionic Organic Compounds**, Science, New Series, Vol. 206, No. 4420, 831–832  
DOI:[10.1126/science.206.4420.831](https://doi.org/10.1126/science.206.4420.831)

- Čokeša, Đ., Radmanović, S., Potkonjak, N., Marković, M., Šerbula, S. (2023) **Soil humic acid and arsenite binding by isothermal titration calorimetry and Dynamic Light Scattering: Thermodynamics and aggregation**, Chemosphere 315, 137687  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137687>
- Costa, A. S. P. N., Nascimento, A. L. A., Botero, W. G., Carvalho, C. M., Tonholo, J., Santos, J. C. C., Anunciação, D. S. (2022) **Interaction between humic substances and arsenic species simulating environmental conditions**, Science of the Total Environment 802, 149779  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149779>
- Courtois, J., Berret, J. F. (2010) **Probing Oppositely Charged Surfactant and Copolymer Interactions by Isothermal Titration Microcalorimetry**, Langmuir 26 (14), 11750–11758  
DOI: [10.1021/la101475x](https://doi.org/10.1021/la101475x)
- Davies, G., Ghabbour, E., A. (2001) **Humic Acids: Marvelous Products of Soil Chemistry**, Journal of Chemical Education 78 (12), 1609–1614  
DOI: [10.1021/ed078p1609](https://doi.org/10.1021/ed078p1609)
- de Melo, B. A. G., Motta, F. L., Santana, M. H. A. (2016) **Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments**, Materials Science and Engineering C 62, 967–974  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.12.001>
- Dorđević, A. i Radmanović, S. (2016), **Pedologija**, Univerzitet u Beogradu - Poljoprivredni fakultet
- Fakour, H., Lin, T. (2014 A) **Effect of Humic Acid on As Redox Transformation and Kinetic Adsorption onto Iron Oxide Based Adsorbent (IBA)**. International Journal of Environmental Research and Public Health 11, 10710–10736  
doi: [10.3390/ijerph111010710](https://doi.org/10.3390/ijerph111010710)
- Fakour, H., Lin, T. (2014 B) **Experimental determination and modeling of arsenic complexation with humic and fulvic acids**. Journal of Hazardous Materials 279, 569–578  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.07.039>
- Fuentes, M., Olaetxea, M., Baigorri, R., Zamarreño, A. M., Etienne, P., Laîné, P., Ourry, A., Yvin, J. C., Garcia-Mina, J. M. (2013) **Main binding sites involved in Fe(III) and Cu(II) complexation in humic-based structures**, Journal of Geochemical Exploration 129, 14–17  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.gexplo.2012.12.015>
- Garcia-Manyes, S., Jiménez, G., Padró, A., Rubio, R., Rauret, G. 2002. Arsenic speciation in contaminated soils. Talanta 58, 97–109  
DOI: [10.1016/s0039-9140\(02\)00259-x](https://doi.org/10.1016/s0039-9140(02)00259-x)
- Ghabbour, E. A., Davies, G., Ghali, N., Mulligan, M. D. (2001) **The effect of temperature on tight metal binding by peat and soil derived solid humic acids**, Canadian Journal of Soil Science 81, 331–336  
DOI: [10.4141/S00-065](https://doi.org/10.4141/S00-065)
- Ghabbour, E. A., Shaker, M., El-Toukhy, A., Abid, I. M., Davies, G. (2006A) **Thermodynamics of metal cation binding by a solid soil-derived humic acid: Binding of Fe(III), Pb(II), and Cu(II)**, Chemosphere 63, 477–483  
doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.08.049](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.08.049)
- Ghabbour, E. A., Shaker, M., El-Toukhy, A., Abid, I. M., Davies, G. (2006B) **Thermodynamics of metal cation binding by a solid soil derived humic acid. 2. Binding of Mn(II), Co(NH<sub>3</sub>)<sup>3+</sup><sub>6aq</sub> and Hg(II)**, Chemosphere 64, 826–833  
doi: [10.1016/j.chemosphere.2005.10.049](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2005.10.049)

- Jones, M. N., Bryan, N. D. (1998) **Colloidal properties of humic substances**, Advances in Colloidal and Interface Science 78, 1–48
- Jovanović, U. D., Marković, M. M., Cupać, S. B., Tomić, Z. P. (2013) **Soil humic acid aggregation by dynamic light scattering and laser Doppler Electrophoresis**, Journal of Plant Nutrition and Soil Science 176, 674–679  
[DOI: 10.1002/jpln.201200346](https://doi.org/10.1002/jpln.201200346)
- Jovanović, U. D., Marković, M. M., Čokeša, Đ. M., Živković, N. V., Radmanović, S. B. (2022) **Self-aggregation of soil humic acids with respect to their structural characteristics**, The Journal of the Serbian Chemical Society 87 (6) 761–773  
[doi.org/10.2298/JSC211125010J](https://doi.org/10.2298/JSC211125010J)
- Koopal, L. K., van Riemsdijk, W. H., Kinniburgh, D. G. (2001) **Humic matter and contaminants. General aspects and modeling metal ion binding**, Pure and Applied Chemistry 73 (12), 2005–2016  
<https://doi.org/10.1351/pac200173122005>
- Leavitt, S., Freire, E. (2001) **Direct measurement of protein binding energetics by isothermal titration calorimetry**, Current Opinion in Structural Biology 11, 560–566  
[https://doi.org/10.1016/S0959-440X\(00\)00248-7](https://doi.org/10.1016/S0959-440X(00)00248-7)
- Lenoble, V., Dang, D. H., Loustau Cazalet, M., Mounier, S., Pfeifer, H.-R., Garnier, C. (2015) **Evaluation and modeling of dissolved organic matter reactivity toward AsIII and AsV – Implication in environmental arsenic speciation**, Talanta 134, 530–537  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.11.053>
- Lilić, J., Cupać, S., Lalević, B., Andrić, V. and Gajić-Kvašček, M. (2014) **Pedological characteristics of open-pit Cu wastes and post-flotation tailings (Bor, Serbia)**, The Journal of Soil Science and Plant Nutrition 14, 161–175  
<http://dx.doi.org/10.4067/S0718-95162014005000013>
- Liu, G., Cai, Y. (2010) **Complexation of arsenite with dissolved organic matter: Conditional distribution coefficients and apparent stability constant**, Chemosphere 81, 890–896  
[doi:10.1016/j.chemosphere.2010.08.002](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.08.002)
- Liu, G., Cai, Y. (2013) **Studying arsenite–humic acid complexation using size exclusion chromatography–inductively coupled plasma mass spectrometry**, Journal of Hazardous Materials 262, 1223–1229  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.043>
- Liu, G., Fernandez, A., Cai, Y. (2011) **Complexation of Arsenite with Humic Acid in the Presence of Ferric Iron**, Environmental Science & Technology 45, 3210–3216  
[dx.doi.org/10.1021/es102931p](https://doi.org/10.1021/es102931p)
- Li, J., Ding, Y., Wang, K., Li, N., Qian, G., Xu, Y., Zhang, J. (2020) **Comparison of humic and fulvic acid on remediation of arsenic contaminated soil by electrokinetic technology**, Chemosphere 241, 125038  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.125038>
- Livens, F. R. (1991) **Chemical reactions of metals with humic material**, Environmental Pollution 70, 183–208  
[https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90009-L](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90009-L)
- Loosli, F., Vitorazi, L., Berret, J. F., Stoll, S. (2015) **Isothermal titration calorimetry as a powerful tool to quantify and better understand agglomeration mechanisms during interaction processes between TiO<sub>2</sub> nanoparticles and humic acids**, Environmental Science: Nano 2, 541–550  
[DOI: 10.1039/c5en00139k](https://doi.org/10.1039/c5en00139k)

- MacCarthy, P. (2001) **The Principles of Humic Substances**, Soil Science 166 (11), 738–751  
[DOI:10.1097/00010694-200111000-00003](https://doi.org/10.1097/00010694-200111000-00003)
- Mahler, C. F., Svierzoski, N. D. S., Bernardino, C. A. R. (2021) **Chemical Characteristics of Humic Substances in Nature**, u:Humic Substances. Urednik: Abdelhadi Makan  
<http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.97414>
- Marković, M., M., Milonjić, S. K. (1992) **Characteristic performances of a Thermometric (LKB) multichannel microcalorimeter and its use for determination of heats of mixing of concentrated electrolytes**, *Thermochimica Acta*, 195, 303-311  
[https://doi.org/10.1016/0040-6031\(92\)80073-6](https://doi.org/10.1016/0040-6031(92)80073-6)
- Martin, M., Celi, L., Barberis, E., Violante, A., Kozak, L. M., Huang, P. M. (2009) **Effect of humic acid coating on arsenic adsorption on ferrihydrite-kaolinite mixed systems**, Canadian Journal of Soil Science 89, 421–434  
<https://doi.org/10.4141/cjss08046>
- Misra, V., Pandey, S. D., Viswanathan, P. N. (1996) **Environmental significance of humic acid in the sequestration of metals**, Chemistry and Ecology 13, 103–112  
<https://doi.org/10.1080/02757549608035523>
- Murphy, E. M., Zachara, J. M., Smith, S. C., Philips, J. L., Wlettsma, T.W. (1994) **Interaction of Hydrophobic Organic Compounds with Mineral-Bound HS**, Environmental Science & Technology 28, 1291-1299  
[DOI: 10.1021/es00056a017](https://doi.org/10.1021/es00056a017)
- Pandey, A. K., Pandey, S. D., Misra, V., Viswanathan, P. N. (1999) **Formation of soluble complexes of metals with humic acid and its environmental significance**, Chemistry and Ecology 16, 269–282  
<https://doi.org/10.1080/02757549908037652>
- Pandey, A. K., Pandey, S. D., Misra, V. (2000) **Stability Constants of Metal-Humic Acid Complexes and Its Role in Environmental Detoxification**, Ecotoxicology and Environmental Safety 47, 195–200, Environmental Research, Section B  
[doi:10.1006/eesa.2000.1947](https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1947), available online at <http://www.idealibrary.com>
- Piccolo, A. (2002) **The Supramolecular Structure of Humic Substances: A Novel Understanding of Humus Chemistry and Implications in Soil Science**, Advances in Agronomy 75, 57–134  
[DOI:10.1016/S0065-2113\(02\)75003-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(02)75003-7)
- Pothier, M. P., Lenoble, V., Garnier, C, Misson, B., Rentmeister, C, Poulain, A. J. (2020) **Dissolved organic matter controls of arsenic bioavailability to bacteria**, The Science of the Total Environment 716, 137118  
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137118>
- Qian, G., Xu, L., Li, N., Wang, K., Qu, Y., Xu, Y. (2022) **Enhanced arsenic migration in tailings soil with the addition of humic acid, fulvic acid and thiol-modified humic acid**, Chemosphere 286, 131784  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.13178>
- Radmanović, S. B., Marković, M. M., Jovanović, U. D., Gojković-Kvašček, M. D., Čokeša, Đ. M., Lilić, J. A. (2020) **Properties of humic acids from copper tailings 20 years after reclamation**, The Journal of the Serbian Chemical Society 85 (3), 407–419  
<https://doi.org/10.2298/JSC190717112R>

- Ren, J., Fan, W., Wang, X., Ma, Q., Li, X., Xu, Z., Wei, C. (2017) **Influences of size-fractionated humic acids on arsenite and arsenate complexation and toxicity to *Daphnia magna***, *Water Research* 108, 68–77  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2016.10.052>
- Ritchie, J. D., Perdue, E. M. (2003) **Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter**. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 67, 85–96  
[https://doi.org/10.1016/S0016-7037\(02\)01044-X](https://doi.org/10.1016/S0016-7037(02)01044-X)
- Schaumann G. E., Thiele-Bruhn, S. (2011) **Molecular modeling of soil organic matter: Squaring the circle?**, *Geoderma* 166, 1–14  
[doi:10.1016/j.geoderma.2011.04.024](https://doi.org/10.1016/j.geoderma.2011.04.024)
- Senesi, N. (1992) **Binding Mechanisms of Pesticides to Soil Humic Substances**, *The Science of the Total Environment*, 123/124, 63–76  
[https://doi.org/10.1016/0048-9697\(92\)90133-D](https://doi.org/10.1016/0048-9697(92)90133-D)
- Source Materials for IHSS Samples**  
<http://humic-substances.org/source-materials-for-ihss-samples>, (accessed May 2017)
- Tan, W. F., Koopal, L. K., Norde, W. (2009) **Interaction between Humic Acid and Lysozyme, Studied by Dynamic Light Scattering and Isothermal Titration Calorimetry**. *Environmental Science and Technology* 43, 591–596  
<https://doi.org/10.1021/es802387u>
- Tipping E., (1998) **Humic Ion-Binding Model VI: An Improved Description of the Interactions of Protons and Metal Ions with Humic Substances**, *Aquatic Geochemistry* 4, 3–48  
DOI: 10.1023/a:1009627214459
- Tombácz, (1999) **Colloidal Properties of Humic Acids and Spontaneous Changes of Their Colloidal State Under Variable Solution Conditions**, *Soil Science* 164 (11), 814–824  
DOI:10.1097/00010694-199911000-00005
- Turkeová, I., Enev, V., Klucakova, M., Krouska, J., Lastuvkova, M. (2015A) **Thermodynamics of metal ion interaction with humic acids.**, *Chemistry and life 2015*, 6<sup>th</sup> Conference, Brno (Czech Republic), Book of abstracts, 60
- Turkeová, I., Vojtech, E., Klucakova, M. (2015B) **Thermodynamic Analysis of Cu(II) and Pb(II) Ion Binding to Humic Acids Isolated from Different Origins and Structural Characterization using FTIR and <sup>13</sup>C NMR Spectroscopy**, *NANOCON 2015*, Brno (Czech Republic), Conference Proceedings, 645
- USDA–NRCS 2015 Elliott series.  
[https://soilseries.sc.egov.usda.gov/OSD\\_Docs/E/ELLIOTT.html](https://soilseries.sc.egov.usda.gov/OSD_Docs/E/ELLIOTT.html). Accessed 15 May 2017
- Von Wandruszka, R. (2000) **Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation**, *Geochemical Transactions*, 2  
<https://doi.org/10.1186/1467-4866-1-10>
- Warwick, P., Inam, E., Evans, N. (2005) **Arsenic's Interaction with Humic Acid**, *Environmental Chemistry* 2(2), 119–124  
<https://doi.org/10.1071/EN05025>
- WHO (2022) **Guidelines for drinking-water quality: the fourth edition incorporating the first and second addenda**. ISBN 978-92-4-004506-4 (electronic version), ISBN 978-92-4-004507-1 (print version)  
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/igo>

- Xu, J., Koopal, L.K., Fang, L., Xiong, J., Tan, W. (2018) Proton and Copper Binding to Humic Acids Analyzed by XAFS Spectroscopy and Isothermal Titration Calorimetry, Environmental Science & Technology 52, 4099–4107*  
<https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06281>
- Ying, L., Qinyan, Y., Baoyu, G., Qian, L., Chunling, L. (2008) Adsorption thermodynamic and kinetic studies of dissolved chromium onto humic acids, Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 65, 25–29*  
[doi:10.1016/j.colsurfb.2008.02.014](https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.02.014)









**BIOGRAFIJA AUTORA:**

Đuro Čokeša rođen je 07.02.1960. godine u Gornjem Primišlju, Republika Hrvatska, gde je završio prvih šest razreda osnovne škole, a sedmi i osmi razred u Lačarku, opština Sremska Mitrovica. Srednju tehničko-tehnološku školu završio je u Sremskoj Mitrovici. Prve dve godine fakulteta završio je na Tehnološkom fakultetu Univerziteta u Novom Sadu, odeljenje u Sremskoj Mitrovici. Drugi deo fakulteta završio je na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu, smer Hemijsko inženjerstvo. Fakultet je upisao školske 1978/79. godine i diplomirao 1983. godine odbranom diplomskog rada sa ocenom 10. Diplomiranjem na Tehnološko-metalurškom fakultetu, sa prosečnom ocenom 8,36, stekao je stručni naziv diplomirani inženjer tehnologije, koji je u pogledu prava izjednačen sa akademskim nazivom master. Doktorske akademske studije upisao je školske 2015/16. godine na Tehničkom fakultetu u Boru, studijski program Tehnološko inženjerstvo. Sve ispite predviđene studijskim programom položio je sa prosečnom ocenom 9,89.

Od 01.06.1984. godine do danas radi u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu i trenutno je u zvanju stručnog savetnika.

Bio je učesnik na 9 projekata koje je finansiralo Ministarstvo nauke Republike Srbije. Sada je učesnik projekta finansiranog od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije (Ugovor broj 451-03-47/2023-01/ 200017; Program: Životna sredina i zdravlje, Podprogram: Zaštita od hemijskih i fizičkih agenasa, Tema: Imobilizacija neorganskih i organskih zagađivača zemljišnim huminskim kiselinama)

Autor ili koautor je 13 radova publikovanih u međunarodnim časopisima iz kategorije M20 (4 rada kategorije M21, 6 radova kategorije M22, 5 radova kategorije M23, 2 rada kategorije M24), 29 saopštenja na konferencijama međunarodnog značaja iz kategorije M30 (11 saopštenja kategorije M33 i 18 saopštenja kategorije M34), 6 radova publikovanih u časopisima nacionalnog značaja iz kategorije M50 (kategorija M52), 20 saopštenja na konferencijama nacionalnog značaja iz kategorije M60 (6 saopštenja kategorije M63 i 14 saopštenja kategorije M64), kao i 11 tehničkih rešenja (kategorija M85)

### Izjava o autorstvu

Potpisan: Đuro Čokeša

Broj indeksa: 16/2015

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

#### **Istraživanje interakcije arsena i huminskih kiselina iz zemljišta**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

U Boru, \_\_\_\_\_

Potpis doktoranda

\_\_\_\_\_

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Đuro Čokeša

Broj indeksa: 16/2015

Studijski program: Tehnološko inženjerstvo

Naslov rada: Istraživanje interakcije arsena i huminskih kiselina iz zemljišta

Mentor: prof dr Snežana Šerbula

Potpisan: Đuro Čokeša

#### Izjavljujem

da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Boru, \_\_\_\_\_

Potpis doktoranda

\_\_\_\_\_

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Istraživanje interakcije arsena i huminskih kiselina iz zemljišta

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao/la sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

U Boru, \_\_\_\_\_

Potpis doktoranda

\_\_\_\_\_

Rad proistekao iz doktorske disertacije:

**Čokeša, Đ., Radmanović, S., Potkonjak, N., Marković, M., Šerbula, S. (2023) Soil humic acid and arsenite binding by isothermal titration calorimetry and Dynamic Light Scattering: Thermodynamics and aggregation, Chemosphere 315, 137687**  
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137687>  
(IF(2021)=8,943 (Environmental Sciences (33/279))  
(ISSN: 0045-6535