

737

2003-2005

תקופת המחקר:

301-0380-05

קוד מחקר:

Subject: BINDING OF HEAVY METAL S TO DOM
FROM SECONDARY EFFLUENT

Principal investigator: Pinchas Fine

Cooperative investigator: URI MINGELGRIN,
BORISOVER MICHAEL

Institute: Agricultural Research Organization (A.R.O)

שם המחקר: קשירת מתכות כבדות לחומר
אורגני מסיס שמקורו במי קולחים

חוקר ראשי: פנחס פיין

חוקרים שותפים: אורי מינגלגרין, מיכאל
בוריסובר

מוסד: מינהל המחקר החקלאי, ת.ד. 6 בית דגן
50250

תקציר

מטרת העבודה - בחינת שימוש במי קולחים שניוניים (להלן מי קולחים) ובמי קולחים שלישוניים (להלן מים שפירים), להשקיית ליזימטרים שבהם ניטעו עצי איקליפטוס.

מהלך העבודה והתוצאות - בדוגמאות החא"מ במקטע הגודל חא"מ $>0.45 \mu\text{m}$, לא נמצאו הבדלים בריכוז הפא"מ בין הנקזים. הבליעה הספציפית (SUVA), המצביעה על ריכוז החומרים הארומטיים בחא"מ, ירדה בסדר הבא: נקז מים שפירים < נקז מי קולחים < מי קולחים. באנליזת $^1\text{H-NMR}$, נמצא שחא"מ ממי הקולחים היו פחות ארומטיים ויותר אליפטיים, מאשר חא"מ משני סוגי הנקזים. כמו כן, חא"מ ממי הקולחים נמצא יותר מחומצן ופולארי מאשר חא"מ בשני סוגי הנקזים. גם באנליזת FTIR, שבוצעה עבור אותן הדוגמאות, נמצא שדוגמאות חא"מ משני סוגי הנקזים היו יותר ארומטיות ופחות מחומצנות, מדוגמאות חא"מ של מי הקולחים.

במפות הפלואורסצנטיות נצפו שני פיקים מרכזיים, שאפיינו חומרים דמויי חומצות פולביות/הולביות. בנוסף לשני הפיקים הנ"ל, בדוגמאות חא"מ של מי הקולחים, אותר פיק נוסף שאפיינו חומרים דמויי חלבונים שמקורם בפירוק מיקרוביאלי, כגון טריפטופן (חומצה אמינית). בנוסף לכך, בחא"מ ממי הקולחים נצפה גם פיק נוסף, ברור פחות, שיוחס לחלבונים ארומטיים. עצמת הפיקים במקטע הקטן, הייתה גבוהה יותר בהשוואה למקטע הגדול יותר, ולכן ניתן לומר שהחא"מ הקטן מולקולארית, מכיל יותר קבוצות פלואורסצנטיות מהחא"מ הגדול מולקולרית. במקטע הגודל $<0.45 \mu\text{m}$ חא"מ $<1 \text{ kDa}$, לפני הומוניזציה (הרוויה) בנתרן, ואחריה, נצפתה קשירה נמוכה יותר של נחושת, ע"י חא"מ ממי קולחים, לעומת החא"מ משני סוגי הנקזים. לאחר תהליך ההומוניזציה, כל דוגמאות החא"מ הראו קשירה נמוכה יותר לנחושת, בהשוואה לדוגמאות החא"מ שלא עברו את התהליך. במקטע הגודל $<1 \text{ kDa}$ חא"מ $<200 \text{ Da}$, לא נמצאו הבדלים בין חא"מ ממי קולחים ובין שני סוגי הנקזים. קשירת הנחושת ע"י החא"מ, הייתה יותר נמוכה מאשר במקטע הגדול. במדידות פלואורסצנטיות נמצא שעלייה בריכוז הנחושת המוספת, גרמה לירידה בעצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ.

הסבר התופעה מיוחס להיווצרות קומפלקס חא"מ נחושת, שאינו פלואורסצנטי. עבור חא"מ ממי הקולחים, הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה הייתה מתונה מאוד, לעומת חא"מ משני סוגי הנקזים, שעבורו הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה הייתה תלולה ויותר משמעותית.

מסקנות - ניתן לומר שחא"מ ממי קולחים, קושר נחושת באתרים שאינם פלואורסצנטיים, ולכן קשירת הנחושת כמעט שאינה משנה את תכונותיו הפלואורסצנטיות. חא"מ משני הנקזים, קושר נחושת בעיקר באתרים פלואורסצנטיים.

דוח סופי לתכנית מחקר מס' 301-380

קשירת מתכות כבדות לחומר אורגני מסיס שמקורו במי-קולחים ובמי-נקז מהשקיה במי-קולחים

Binding of heavy metals to DOM that originates from effluent irrigation

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות, צוות היגוי "שימוש בקולחים ומים מושבים וייעול השימוש במים" (02-0382), ע"י

פנחס פיין, המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

Pinchas Fine, Inst. of Soil, Water and Environ. Sci., The Volcani Center, Bet Dagan
50250; finep@volcani.agri.gov.il

אורי מינגלגרין, המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

Uri Mingelgrin, Inst. of Soil, Water and Environ. Sci., The Volcani Center, Bet Dagan
50250; uriming@volcani.agri.gov.il

מיכאל בוריסובר, המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

Mikhail Borisover, Inst. of Soil, Water and Environ. Sci., The Volcani Center, Bet
Dagan 50250; vwmichel@volcani.agri.gov.il

אנה בריוזקין, המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

Anna Beriozkin, Inst. of Soil, Water and Environ. Sci., The Volcani Center, Bet Dagan
50250; shomron-anna@narod.ru

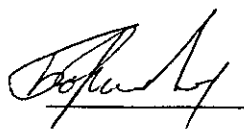
רויטל חייט, המכון למדעי הקרקע המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

Revital Hayat, Inst. of Soil, Water and Environ. Sci., The Volcani Center, Bet Dagan
50250; revutalh@post.tau.ac.il

שותפים לדוח:

נדזיה בוחנובסקי, שושי סוריאנו

הממצאים בדו"ח הם תוצאות ניסויים ואינם מהווים המלצות לחקלאים



חתימת החוקר הראשי

המכון למדעי הקרקע, המים והסביבה, מרכז וולקני

יוני 2006

1. תקציר

בעבודה זו, נעשה שימוש במי קולחים שניוניים (להלן מי קולחים) ובמי קולחים שלישוניים (להלן מי שפירים), להשקיית לזימטרים שבהם ניטעו עצי איקליפטוס. בדוגמאות החא"מ במקטע הגודל חא"מ $> 0.45 \mu\text{m}$, לא נמצאו הבדלים בריכוז הפא"מ בין הנקזים. הבליעה הספציפית (SUVA), המצביעה על ריכוז החומרים הארומטיים בחא"מ, ירדה בסדר הבא: נקז מים שפירים < נקז מי קולחים < מי קולחים. באנליזת $^1\text{H-NMR}$, נמצא שחא"מ ממי הקולחים היו פחות ארומטיים ויותר אליפטיים, מאשר חא"מ משני סוגי הנקזים. כמו כן, חא"מ ממי הקולחים נמצא יותר מחומצן ופולארי מאשר חא"מ בשני סוגי הנקזים. גם באנליזת FTIR, שבוצעה עבור אותן הדוגמאות, נמצא שדוגמאות חא"מ משני סוגי הנקזים היו יותר ארומטיות ופחות מחומצנות, מדוגמאות חא"מ של מי הקולחים. במפות הפלואורסצנטיות נצפו שני פיקים מרכזיים, שאפיינו חומרים דמויי חומצות פולביות/הולביות. בנוסף לשני הפיקים הנ"ל, בדוגמאות חא"מ של מי הקולחים, אותר פיק נוסף שאפיינו חומרים דמויי חלבונים שמקורם בפירוק מיקרוביאלי, כגון טריפטופן (חומצה אמינית). בנוסף לכך, בחא"מ ממי הקולחים נצפה גם פיק נוסף, ברור פחות, שיוחס לחלבונים ארומטיים. עצמת הפיקים במקטע הקטן הייתה גבוהה יותר בהשוואה למקטע הגדול יותר, ולכן ניתן לומר שהחא"מ הקטן מולקולרית, מכיל יותר קבוצות פלואורסצנטיות מהחא"מ הגדול מולקולרית. במקטע הגודל חא"מ $< 0.45 \mu\text{m}$ $< 1 \text{ kDa}$, לפני הומיוניזציה (הרוויה) בנתרן, ואחריה, נצפתה קשירה נמוכה יותר של נחושת, ע"י חא"מ ממי קולחים, לעומת החא"מ משני סוגי הנקזים. לאחר תהליך ההומיוניזציה, כל דוגמאות החא"מ הראו קשירה נמוכה יותר לנחושת, בהשוואה לדוגמאות החא"מ שלא עברו את התהליך. במקטע הגודל חא"מ $< 1 \text{ kDa}$ $< 200 \text{ Da}$, לא נמצאו הבדלים בין חא"מ ממי קולחים ובין שני סוגי הנקזים. קשירת הנחושת ע"י החא"מ, הייתה יותר נמוכה מאשר במקטע הגודל במדידות פלואורסצנטיות נמצא שעלייה בריכוז הנחושת המוספת, גרמה לירידה בעצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ. הסבר התופעה מיוחס להיווצרות קומפלקס חא"מ נחושת, שאינו פלואורסצנטי. עבור חא"מ ממי הקולחים, הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה הייתה מתונה מאוד, לעומת חא"מ משני סוגי הנקזים, שעבור הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה הייתה תלולה ויותר משמעותית. ניתן לומר שחא"מ ממי קולחים, קושר נחושת באתרים שאינם פלואורסצנטיים, ולכן קשירת הנחושת כמעט שאינה משנה את תכונותיו הפלואורסצנטיות. חא"מ משני הנקזים, קושר נחושת בעיקר באתרים פלואורסצנטיים.

2. רקע תיאורטי

הגורמים העיקריים שמשפיעים על החא"מ במי-נקז מקרקע מושקית במי-קולחים הם הרכב המים, משטר השטיפה, הפעילות המיקרוביאלית ופעילות השורשים. משטר השטיפה משפיע על מידת ההתרכוזות של החא"מ במי-הנקז, שמקורו במי-קולחים ובשורשים, מחד גיסא, ועל מידת פירוקו, מאידך גיסא. הצמח תורם חא"מ לקרקע ולמי-הנקז מהפרשות שורש ומתמותות שורשים. חא"מ במים, ובכלל זאת חא"מ במי-קולחים ומי-נקז, מכיל מרכיבים שונים ובין היתר חלבונים ומבנים דמויי חלבון, חומצות פולביות והומיות, פחמימות (רב-סוכרים) וקומפלוקסים של מרכיבים אלה עם מתכות שונות (בעיקר מתכות מעבר) ועם מולקולות אורגניות אחרות. העבודות שלנו ושל אחרים (כגון, Manka et al., 1974; Peschel and Wildt, 1988) מראות כי החא"מ במי-קולחים הוא בעיקרו קטן-מולקולרי (רובו ככולו קטן מ 30 kDa), כי הוא מכיל קבוצות אמידיות, עשיר יחסית בקבוצות קרבוקסיליות ודל בקבוצות ארומטיות יחסית לחומר אורגני מייצג (כגון, מקרקעות). החא"מ במי-קולחים הידרופילי מאד יחסית לחומר האורגני של הקרקע (כלומר, יש בו שיעור גבוה של חומצות פולביות). מרבית החא"מ אינו ניתן להגדרה מדויקת אלא רק להגדרה פונקציונלית. הפרדות מקובלות כגון לפי הידרופיליות/ליפופיליות, מוגבלות בערך המידע שהן מספקות. במקום זאת, אנו מציעים לנצל מדידות פלואורסצנטיות לאיפיון החא"מ של מי הקולחים ומי הנקז. שילוב הנתונים המתקבלים עם נתונים מטיטציה של חא"מ עם נחושת מאפשר קבלת מידע נוסף על אופי החא"מ וקשירתו לנחושת. מיפוי ספקטרום פלואורסצנטי תלת מימדי, אנליזת פרוטונים ($^1\text{H-NMR}$) ואנליזת FTIR, אפשרו ניתוח נוסף ומעמיק יותר, של ההבדלים בהרכב החא"מ מהמקורות השונים.

3. הפעלת המחקר: תכנית עבודה ושיטות

תכנית העבודה הייתה כלהלן:

אבני דרך (פרק 6 בהצעת המחקר):

שנה ראשונה: גיזום והעתקת עצי איקליפטוס למכלים חדשים (בוצע). הפקת חא"מ ומקטעיו ממי-קולחים (בוצע) ומבוצה; העמסת מי-הקולחים במכלים עם חול דיונה לשם הפקת חא"מ מיושן

ומיוצב. פיתוח השיטה למיפוי ספקטרום פלואורומטרי תלת-מימדי (בביצוע); איפיון החא"מ (מדידות פלואורסצנציה) (בביצוע), FTIR, ו-LCMS. תשלחנה מספר דוגמאות לאנליזת NMR (בוצע); פיתוח מערכות ה-ISE והדיאליזה לקביעת מדדי הקומפלקסציה (בביצוע).
שנה שנייה: איפיון החא"מ בעזרת אלקטרודת נחושת ספציפית (ISE) ושילוב שיטה זו עם אנליזה ספקטרלית – פלוריסנציה (בוצע). אנליזת H-NMR ו-FTIR (בוצע), מיפוי פלואורסצנטי תלת מימדי (בוצע)
שנה שלישית: בשנה זו עסקנו בעיקר בריכוז המידע הרב שהתקבל ובעיבוד הנתונים. כמו כן המשכנו במדידות פלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ, ובהשוואה בין הנתונים שהתקבלו משימוש באלקטרודת נחושת ספציפית, ובין הנתונים הפלואורסצנטיים.

4. חומרים ושיטות:

4.1 כללי:

הניסוי נערך באתר השפד"ן. ליזימטרים שבהם ניטעו עצי איקליפטוס, הושקו במי קולחים שניוניים מאתר השפד"ן (להלן מי-קולחים), או במי קולחים שלישוניים, שהתקבלו לאחר תקופת זמן שבה שהו הקולחים השניוניים בקרקע (להלן מים שפירים). בדומה לניסוי המדווח ע"י Fine et al., 2002. ההשקיה הייתה גירעונית החל בחודשים יוני-יולי 2003, עד השטיפה של חתך הקרקע בראשית נובמבר 2003. חתך הקרקע בליזימטרים נשטף ב-50 ליטרים של מי ברז, (כ-2-3 נפחי נקבובים), והעצים היו בני שנתיים בזמן איסוף הנקזים.
 הדוגמאות שנלקחו לאנליזה מעבדתית היו משלושה סוגים:
 1. מי קולחים (נלקחו ארבע דגימות במהלך השנה)
 2. נקזים מליזימטרים שהושקו במי קולחים (להלן נקז קולחים)
 3. נקזים מליזימטרים שהושקו במים שפירים (להלן נקז שפירים)
 לדוגמאות הוסף סודיום אזיד בריכוז סופי של 0.02%, למזעור הפעילות המיקרוביאלית. כל הדוגמאות נשמרו בקירור, ב-4 °C, עד להמשך האנליזה.

4.2 חומרים:

כל החומרים שבהם נעשה שימוש, היו מדרגת ניקיון אנליטית. NaOH, H₂SO₄, HNO₃, HCl, Na₄EDTA, Cu(NO₃)₂, NaCl היו מתוצרת Merck. הכנת התמיסות והמיהולים השונים בוצעו בשימוש במים מזוקקים פעמיים (מים חסרי יונים שעברו ניקוי נוסף בתהליך של אוסמוזה הפוכה), במכשיר מתוצרת Millipore (Q5, 5659C WATER). כל הכלים שבהם נעשה שימוש, הושרו בחומצה חנקתית מהולה. לאחר מכן נשטפו במים חסרי יונים, במים מזוקקים פעמיים, יובשו והוכנו לשימוש.

4.3 שיטות:

4.3.1 איפיון בסיסי:

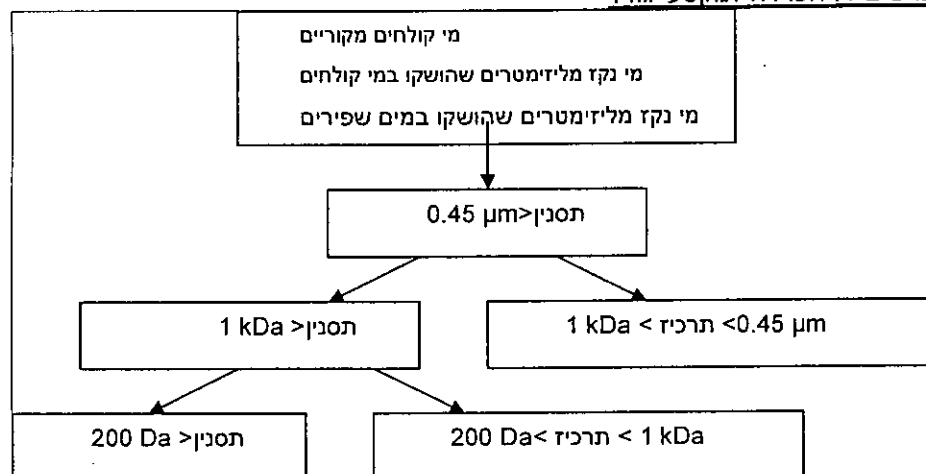
בכל הדוגמאות משלבי הטיפול וההפרדה השונים (שיפורטו בהמשך), נמדדו ערכי pH, חוזק יוני, וצפיפות אופטית באורך גל של 256 nm.
 pH נמדד באמצעות אלקטרודת pH מתוצרת Orion, בפוטנציומטר מתוצרת חברת Denver Instrument, model 50. באפרים מתוצרת Merck (pH4, pH7, pH9), שימשו לכויל האלקטרודה. הכיול נעשה בתחילת כל יום עבודה. החוזק היוני נבדק באמצעות אלקטרודת מוליכות ומד מוליכות מתוצרת חברת Cyberscan, מודל CON 510.
 הצפיפות האופטית נבדקה בספקטרופוטומטר UV-VIS מתוצרת Uvikon, מודל 933. מתוך הצפיפות האופטית שנבדקה באורך גל של 256 nm, חושבה בליעה ספציפית (SUVA). הבליעה הספציפית באורכי גל של 250-280 nm, נותנת מדד לריכוז החומרים הארומטיים בחא"מ (Traina et al., 1990; Chin et al., 1994). הבליעה הספציפית מחושבת ע"י חלוקת הצפיפות האופטית שהתקבלה ב-256 nm הפא"מ, ומתקבלת ביחידות של ליטר/מ"ג*מטר.
 בכל הדוגמאות נבדקה גם תכולת פחמן ותכולת מתכות. תכולת הפחמן נבדקה במכשיר מתוצרת Skalar, מודל Formacs^{HT} TOC Analyser. כיול המכשיר בוצע עם סטנדרטים של פחמן אורגני ופחמן אי אורגני, עפ"י הפרוצדורה המפורטת בחוברת המכשיר. כל החומרים שמהם הוכנו הסטנדרטים היו מתוצרת Merck ובדרגת ניקיון אנליטית.
 תכולת המתכות נבדקה במכשיר ICP-AES מתוצרת Spectro, Spectro flame modula E. לשם השוואה הוכנו גם תמיסות Blank שעברו עיכול בחומצה. לדוגמאות עם תכולת פחמן נמוכה הוספה חומצה חנקתית

מרוכזת, לריכוז סופי של 1%. כיוול המכשיר בוצע ע"י בדיקת תמיסות סטנדרט המכילות את היונים הנבדקים. כל התמיסות היו תוצרת Merck ובדרגת ניקיון ל-ICP.

4.3.2 הפקת החא"מ והפרדתו למקטעי גודל:

מי הקולחים המקוריים ושני סוגי מי הנקז מהליזימטרים, סוננו בפילטר העשוי מפוליפרופילן, בקוטר נקבובים של $0.45 \mu\text{m}$. הסינון בוצע בלחץ של 1.36 אטמוספרות. התסנין המתקבל, $<0.45 \mu\text{m}$, הוא, עפ"י הגדרה, החומר האורגני המומס (חא"מ). בהמשך הופרד החא"מ למקטעי גודל, באמצעות שימוש בננו-פילטרציה על ממברנות סלקטיביות. ההפרדה הראשונה נעשתה על ממברנה סלקטיבית של 1kDa תוצרת Pall Filtron. בלחץ של 1.36 אטמוספרות. הפרדה נוספת של התסנין הקטן מ-1kDa, בוצעה על ממברנה סלקטיבית של 200Da, תוצרת Koch, באמצעות Steered cell בנפח שלושה ליטרים ובלחץ של 2.46 אטמוספרות. מקטעי הגודל השונים מוצגים בתרשים 1

תרשים 1: הפרדה למקטעי גודל



4.3.3 ההומיוניזציה של החא"מ :

תהליך ההומיוניזציה בוצע על חא"מ במקטע הגודל $<1\text{kDa}$ חא"מ $<0.45 \mu\text{m}$, ובשלושת סוגי המים. מטרת התהליך הייתה להחליף קטיונים הקשורים לחומר האורגני, בנתרן. באנליזת NMR (שתפורט בהמשך), ההומיוניזציה הייתה הכרחית ע"מ לנטרל את השפעת היונים הפאראמגנטיים הגורמים להרחבת הפיקים (Gélinas et al., 2001). התהליך מתבצע בתוך stirred cell בנפח 300 מ"ל, תוצרת micon, עם ממברנה סלקטיבית של 200 Da, ובלחץ של 2.46 אטמוספרות עפ"י השלבים הבאים:

1. ל-120 מ"ל של דוגמת החא"מ, הוספו 30 מ"ל NaCl בריכוז 2.5 M לקבלת נפח סופי של 150 מ"ל בריכוז 0.5 M NaCl
2. ערבוב למשך שעה
3. מיהול לנפח של 300 מ"ל
4. ערבוב למשך שעה
5. דחיקה בלחץ עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 1
6. הוספת 50 מ"ל NaCl בריכוז 0.5 M
7. ערבוב למשך שעה
8. מיהול לנפח של 300 מ"ל
9. ערבוב למשך שעה
10. דחיקה בלחץ עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 2
11. הבאת ה-pH ל-10 עם NaOH
12. ערבוב למשך שעה
13. מיהול לנפח של 300 מ"ל
14. ערבוב למשך שעה
15. דחיקה בלחץ עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 3
16. הבאת ה-pH ל-3.8 עם HCl
17. ערבוב למשך שעה

18. מיהול לנפח של 300 מ"ל
19. ערבוב למשך שעה
20. דחיקה בלחץ עד לנפח של 120 מ"ל ואיסוף תסנין מס' 4
21. בדיקת החוזק היוני ומהולים נוספים ודחיקות בלחץ, עד לקבלת 120 מ"ל של התרכיז ההומיוני עם מוליכות חשמלית של $\sim 1 \text{ mS/cm}$
22. איסוף התרכיז ההומיוני (120 מ"ל)
23. איסוף תסנין מס' 5 (נפח התסנין תלוי במהולים לקבלת המוליכות החשמלית הרצויה)

4.3.4 ייבוש דוגמאות חא"מ:

דוגמאות חא"מ של התרכיז ההומיוני, במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא} < 1 \text{ kDa}$, וכן דוגמאות חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא} < 200 \text{ Da}$, עברו ייבוש בהקפאה. החומר היבש נשמר בדסיקטור ושימש לאנליזות הבאות (4.3.5-4.3.6).

4.3.5 ספקטרוסקופיית $^1\text{H-NMR}$:

אנליזת פרוטונים בוצעה במכשיר NMR מתוצרת Bruker Avance 400 MHz. כ-5 מ"ג מהחומר היבש, הומסו בכ-1 מ"ל של D_2O , עד לקבלת תמיסה צלולה.

4.3.6 ספקטרוסקופיית FTIR:

אנליזת FTIR בוצעה במכשיר מתוצרת Bruker, מודל FTIR Vector 2.2. כ-2 מ"ג מהחומר היבש נכתשו עם כ-100 מ"ג KBr שאינו בולע בתחום ה-IR, עד לקבלת אבקה דקה. האבקה נדחקה בלחץ לדיסקה דקה וזו עברה אנליזה במכשיר.

4.3.7 מיפוי ספקטרופולורימטרי תלת מימדי:

הדוגמאות שלהן בוצע המיפוי היו חא"מ במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא} < 1 \text{ kDa}$, וחא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא} < 200 \text{ Da}$, ובשלושת סוגי המים. הדוגמאות מופו לפני הוספת נחושת, ועם ריכוז מירבי של נחושת ($p\text{Cu}=3.5$). בעזרת ספקטרופולורימטר מתוצרת Shimadzu, מודל RF-5301 PC, התמיסות נבדקו בתא קוורץ סטנדרטי בקוטר 1 ס"מ, עם מנורת קסנון 150W, תוצרת Ushio Inc., Japan. המפות התלת ממדיות של עירור ופליטה (EEM-Excitation Emission Matrix), הופקו בטמפרטורה של $23 \pm 2^\circ\text{C}$, ברוחב חלון (slit) של 5 nm. הקריאות היו יציבות במהלך המדידה וה-Lamp decay לא עלה על 5% ולא הייתה לו השפעה על עוצמות הפלוריסנציה היחסיות של הדוגמאות השונות. לבדיקת יציבות המכשיר נבדק פיק ראמן של המים ב-348 nm. העירור נמדד בטווח אורכי הגל 210-590 nm, כל 4 nm והפליטה נבדקה בטווח אורכי הגל 220-590 nm, כל 2 nm.

4.3.8 טיטרציה של דוגמאות חא"מ עם נחושת:

מסרת השלב הנוכחי הייתה לאפיין את הקשירה של נחושת כמתכת מודל, אל החא"מ. הטיטרציה בוצעה עם חא"מ במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא} < 1 \text{ kDa}$, כפי שהוא ולאחר הומויניזציה ועם חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא} < 200 \text{ Da}$, ובשלושת סוגי המים. לכל דוגמת חא"מ בוצעו שתי טיטרציות (חזרות), ע"מ להשוות תוצאות. ביצוע הטיטרציה נערך במכחות אלקטרודות pH, מד טמפרטורה, אלקטרודת נחושת ספציפית (Orion 94-29) ואלקטרודת ייחוס (אלקטרודת קלומל Orion 90-02). הטיפול באלקטרודות נעשה לפני כל תחילת עבודה ובסיומה. לפני תחילת העבודה אלקטרודות ה-pH נשטפה ויובשה. ה-pH נבדק באמצעות באפרים ($p\text{H}4, p\text{H}7$) והאלקטרודה כוילה במקרה הצורך. מד הטמפרטורה גם הוא נשטף ויובש. אלקטרודות הנחושת נשטפה ולאחר מכן נוקתה על דף אלומיניום אוקסיד, תוצרת Orion, במשך 30 שניות. אלקטרודת הייחוס המכילה תמיסות מילוי (תוצרת Orion), נוקתה ע"י החלפת התמיסה החיצונית ($10\% \text{ w/v KNO}_3$) והתמיסה הפנימית (בפר AgCl) ולאחר מכן נשטפה ויובשה. לאחר מכן בוצע כיול של אלקטרודות הנחושת, בתחום ריכוזי הנחושת $p\text{Cu}7$ - $p\text{Cu}2$. 50 מ"ל של מים הובאו למוליכות חשמלית של $\sim 1 \text{ mS/cm}$ (בשימוש בתמיסת ISA של $\text{Na}(\text{NO}_3)_2$ מתוצרת Orion). ה-pH הורד ל-4.6-4.8 בשימוש בחומצה חנקתית מהולה. התמיסה מעורבבת והאלקטרודות שעברו ניקוי מוכנסות לתוכה. ההתייצבות בקריאות מתקבלת לאחר זמן כאשר השינוי בפוטנציאל האלקטרודה אינו עולה על 0.3 mV במשך 3 דקות. לאחר ההתייצבות מתחילים בהוספה של תמיסת נחושת חנקתית בכמויות קטנות ובריכוזים עולים עד להתייצבות סופית של הקריאות בריכוז נחושת גבוה. הטיטרציה של הדוגמא נערכה בדומה לכיול כאשר התמיסה שמטוּררת בשלב זה מכילה חא"מ.

הכנת הדוגמא לטיטרציה, כללה את השלבים הבאים:

1. מיהול ל-20 מ"ג לליטר של פחמן אורגני.
2. הורדת ה-pH ל-3.8 באמצעות חומצה חנקתית בריכוז 1M, ע"מ לסלק את כל הקרבונטים.
3. העלאת ה-pH ל-4.6 – 4.8.
4. הבאת המוליכות החשמלית ל- 1 ms/cm .

השינוי בנפח התמיסה במהלך הטיטרציה היה זניח (פחות מ-4%). הטיטרציה נמשכה עד להתייצבות הקריאות. בסיום העבודה (כמו גם בין כל כיוול לטיטרציה), האלקטרודות הוצאו מתוך התמיסה ועברו ניקוי. אלקטרודת ה-pH נשטפה, יובשה ונשמרה בתמיסת שימור. מד הטמפרטורה נשטף ויובש. אלקטרודת הנחושת ואלקטרודת הייחוס נשטפו ויובשו. לאחר מכן הוכנסו לתמיסת H_2SO_4 בריכוז 0.025 M למשך 5 דקות, נשטפו ויובשו שוב והוכנסו לתמיסת Na_4EDTA בריכוז 0.1 M ל-5 דקות נוספות. לבסוף בוצעה שטיפה נוספת, אלקטרודת הנחושת יובשה ונאטמה ואלקטרודת הייחוס נסגרה ונשמרה במים מזוקקים פעמיים.

תגובת האלקטרודה לנחושת, בתמיסת הכיול, תאמה את משוואת נרנסט עבור יון דו ערכי, והייתה $\sim 28 \text{ mV/pCu}$.

קריאות אלקטרודת הנחושת תורגמו לריכוז הנחושת החופשית בתמיסה, עפ"י נתוני עקומת הכיול. ריכוז הנחושת הקשורה חושב כהפרש בין ריכוז הנחושת הכללי שהוסף במהלך הטיטרציה, לבין ריכוז הנחושת החופשית שחושב עפ"י עקומת הכיול. מהנתונים שהתקבלו, נבנו איזותרמות קשירה של החא"מ לנחושת (ריכוז הנחושת הקשורה כפונקציה של ריכוז הנחושת החופשי). ע"י נרמול של ריכוז הנחושת הקשורה ליחידת משקל של החא"מ, ניתן היה לערוך השוואה בין סוגי הח"מ השונים.

4.3.9 אפיון משולב של החא"מ:

הדוגמאות שלהן בוצע האפיון המשולב היו חא"מ במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, וחא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$. כל דוגמת חא"מ נמהלה לריכוז פא"מ של $\sim 20 \text{ ppm}$ (התמיסה הוכנה עפ"י השלבים המצוינים בסעיף 1.3.8) ובנוסף סט של תמיסות חא"מ בתוספת ריכוזים עולים של נחושת (3.5-5.5 pCu). לכל דוגמא נערכו שתי חזרות ע"מ לאפשר השוואת תוצאות.

התמיסות נבדקו ראשית באמצעות שיטת האלקטרודה הספציפית (כמתואר בסעיף 4.3.8). נמצאו ריכוזי הנחושת במצב חופשי ובמצב קשור. לאחר מכן התמיסות נלקחו לבדיקה בספקטרופלווארימטר (כמתואר בסעיף 4.3.7). עבור כל תמיסת חא"מ ללא נחושת, הופק ספקטרום הפליטה ונמצא אורך הגל שבו פליטת האנרגיה מכסימלית (λ_{em}). באורך גל זה הופק ספקטרום העירור ונמצא אורכי הגל לעירור (λ_{ex} , λ_{ex}). התמיסות המכילות נחושת עוררו באורכי הגל שנמצאו. דוגמת חא"מ ללא נחושת נמהלה פי 2 ובבדיקה השפעת ריכוז החא"מ על מיקום שיאי הבליעה והפליטה. הקריאות היו יציבות במהלך המדידה, וה-Lamp decay לא עלה על 5% ולא הייתה לו השפעה על עוצמות הפלווארסצנטיה היחסיות של הדוגמאות השונות. לבדיקת יציבות המכשיר נבדק פיק ראמן של המים ב- 348 nm . השוואת אופי קשירת הנחושת של דוגמאות חא"מ שונות, מתאפשר לאחר ביטול השפעת הבליעה החלקית החוזרת של הקרינה הנפלטת ע"י החא"מ (IFE-Inner Filter Effect). לשם כך נמדדה הצפיפות האופטית של כל התמיסות באורכי הגל של העירור והפליטה. התיקון בוצע בהתאם לשיטה של Gauthier et al., 1986.

5. תוצאות ודיון:

(הגרפים שאליהם מתייחסות התוצאות, מצויים בנספח 4)

5.1 אפיון בסיסי של דוגמאות החא"מ:

החא"מ של מי הקולחים ודוגמאות הנקזים (נקז שפירים ונקז קולחים), התקבל לאחר סינון הדוגמאות דרך פילטר בגודל נקבובים של $0.45 \mu\text{m}$. האפיון הבסיסי כלל תכולת פחמן אורגני מומס-פא"מ (DOC), תכולת פחמן אי-אורגני מומס (DIC), pH, צפיפות אופטית (OD) ב- 256 nm ובליעה ספציפית (SUVA) באורך גל זה, ותכולת מתכות. התוצאות העיקריות, מרוכזות בטבלה 1 (ריכוז המתכות, למעט נחושת, מופיע בנספח 1). תכולת פחמן אורגני ואי-אורגני מומס (DOC, DIC), הייתה גבוהה יותר בשני סוגי הנקזים, מאשר במי הקולחים. מי הקולחים הכילו יותר פחמן אי-אורגני מומס, מאשר פחמן אורגני מומס. לא נצפתה עלייה בריכוז הפא"מ בנקז קולחים, לעומת נקז שפירים. pH של כל הדוגמאות היה דומה 8.2 ± 0.3 . מהצפיפות האופטית שנבדקה ב- 256 nm , חושבה הבליעה הספציפית (SUVA), ביחידות של ליטר/מ"ג*מטר. התוצאות שהתקבלו היו בסדר עולה, נקז שפירים > נקז קולחים > מי קולחים, (2.05-1.77; 1.37-1.06, $0.71-1.06 \text{ ליטר/מ"ג*מטר}$, בהתאמה). ערכי ה-SUVA הנמוכים שהתקבלו עבור חא"מ ממי הקולחים,

הצביעו על ריכוז נמוך של חומרים ארומטיים, ביחס לחא"מ משני סוגי הנקזים. Zumstein and Buffle (1989), מצאו שחא"מ שמקורו בקרקע, הוא יותר ארומטי מחא"מ שמקורו בדוגמאות מימיות. Saadi וחבריו, (2006), בדקו חא"מ בדוגמאות של שפכים מטופלים (ממתקן טיהור שפכים בעיר חיפה, וממאגר השפכים המטופלים המצוי בקישון), והראו ערכי SUVA ב-254, הדומים לערכים שהתקבלו בעבודה זו עבור מי הקולחים, (1.18, 1.07 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה). לאחר אינקובציה שנמשכה 2-4 חודשים, בטמפרטורת החדר, הם מצאו עלייה בערכי הבליעה הספציפית, עקב פירוק מיקרוביאלי סלקטיבי של חומרים בחא"מ בעלי בליעה נמוכה בתחום ה-UV. חא"מ משני סוגי הנקזים, הראה ערכי SUVA גבוהים יותר, האופייניים לחא"מ בקרקע. חא"מ בקרקעות, בעל אופי יותר ארומטי מכיוון שהוא עובר פירוק מיקרוביאלי, שבסופו מתרכזים החומרים הארומטיים, העמידים יותר, שמאופיינים בבליעה חזקה בתחום ה-UV, (Fiedler and Kalbitz, 2003; Guo and Chorover, 2003). Imai וחבריו, (2002), חישוב בליעה ספציפית ב-260, עבור דוגמאות חא"מ ממקורות שונים. בשפכים עירוניים לאחר טיפול, החא"מ הראה בליעה ספציפית גבוהה יותר מחא"מ מהשפכים שלפני טיפול (1.7 לעומת 0.7 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה). חא"מ משפכים מטופלים הראה בליעה ספציפית נמוכה בהרבה מזו של חא"מ מקרקע של יער (0.7 לעומת 2.1 ליטר/מ"ג*מטר, בהתאמה). חא"מ מנקז שפירים הראה ערכי SUVA גבוהים יותר מאשר חא"מ מנקז קולחים. ההסבר לתופעה אינו פשוט, ובהכרח קשור לתהליכים מיקרוביאליים המתרחשים בקרקע. ידוע שתוספת חא"מ ממי הקולחים, מגבירה את הפעילות המיקרוביאלית בקרקע. ייתכן שבנוסף לפירוק המיקרוביאלי, ישנה גם צריכה של חומרים אורגניים ובניהם חומרים ארומטיים הנוצרים בעת הפירוק, מה שגורם לירידה בערכי ה-SUVA עבור חא"מ המופק מנקז קולחים. ריכוז הנחושות בדוגמאות החא"מ ממי קולחים, היה נמוך מזה שבדוגמאות הנקזים, (למעט דוגמת נקז קולחים אחת), אך בשימוש בשיטה סטטיסטית מסוג Anova, נמצא שההבדלים בין שלושת סוגי החא"מ קטנים יחסית.

טבלה 1: אפיון בסיסי של חא"מ, ($0.45 \mu\text{m}$), מי הקולחים ומי נקז

סוג הדוגמא	סימול הדוגמא*	DOC mg/L	DIC mg/L	pH	OD256	SUVA L/mg*m	Cu $\mu\text{g/L}$
מי קולחים-1	EW1	82	58	8.2	0.20	0.71	4.0
מי קולחים-2	EW2	62	48	8.5	0.19	0.73	7.7
מי קולחים-3	EW3	17	71	8.4	0.18	1.06	6.2
מי קולחים-4	EW4	28	35	7.9	0.20	0.71	5.7
נקז שפירים-1	TL1	163	89	7.9	2.89	1.77	25.6
נקז שפירים-2	TL2	177	117	8.2	3.63	2.05	11.8
נקז שפירים-3	TL3	233	125	8.3	4.70	2.02	9.8
נקז שפירים-4	TL4	298	224	8.4	5.93	1.99	10.6
נקז קולחים-1	EL1	268	249	8.1	3.67	1.37	3.8
נקז קולחים-2	EL2	319	270	8.3	5.49	1.72	47.7
נקז קולחים-3	EL3	220	169	8.2	3.77	1.71	18.1
נקז קולחים-4	EL4	161	112	8.1	2.66	1.65	11.9

* EW - מי קולחים, TL - נקז שפירים, EL - נקז קולחים

5.2 הפקת החא"מ והפרדתו למקטעי גודל:

רוב החא"מ היה מצוי בתסנין הקטן מ-1 kDa. אפיון בסיסי של מקטעי הגודל $0.45 \mu\text{m}$ < חא"מ < 1 kDa, חא"מ > 1 kDa, 1 kDa < חא"מ < 200 Da, חא"מ > 200 Da, מופיעים בנספח 2.

5.3 הומיוניזציה של דוגמאות חא"מ במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m}$ < חא"מ < 1 kDa:

תהליך ההומיוניזציה בוצע לחא"מ במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m}$ < חא"מ < 1 kDa. מטרת התהליך הייתה להרוות את החא"מ בנתרן, ע"מ להחליף מתכות הקשורות לחא"מ בנתרן שמאופיין בקשירה חלשה יחסית לחא"מ. דוגמאות חא"מ לפני ואחרי הומיוניזציה, עברו אפיון בסיסי. התוצאות מרוכזות בנספח 3, ותוצאות נבחרות מוצגות בטבלה 2. ריכוז הפא"מ ירד לאחר התהליך. מכיוון שההומיוניזציה בוצעה ע"י שימוש בממברנה בגודל נקבובים של 200 Da, ניתן לומר שהפא"מ שאבד בתהליך היה בעיקרו קטן מ-200 Da. pH, גם הוא ירד לאחר התהליך. ערכי SUVA, באורך גל 256, ירדו בחא"מ ממי הקולחים לאחר תהליך ההומיוניזציה, אך עבור שני סוגי הנקזים נצפתה עלייה בערכים אלה לאחר התהליך. המתכות שסולקו

בתהליך, היו בעיקר מתכות מאקרו (Ca, Mg, K). עבור מתכות המיקרו (מתכות המעבר), הסילוק היה פחות יעיל.

טבלה 2: אפיון בסיסי של דוגמאות חא"מ לפני ואחרי הומוניזציה:

Ca mg/L	Mg mg/L	Fe µg/L	Cu µg/L	SUVA L/mg*m	OD ₂₅₆	pH	DOC mg/L	סימול הדוגמא*
62.5	25.0	1480.0	31.0	1.08	0.96	6.1	89	EW2-BH
10.0	4.6	307.0	20.8	0.54	0.34	5.2	63	EW2-AH
57.6	23.8	130.0	16.7	1.42	0.54	5.9	38	EW4-BH
nd	nd	nd	nd	1.24	0.46	5.5	37	EW4-AH
55.7	41.7	330.3	38.5	2.72	11.0	5.4	404	TL1-BH
<IDL	<IDL	388.0	6.7	3.07	10.2	4.5	332	TL1-AH
115.3	52.5	602.8	88.5	3.53	16.1	5.8	456	TL3-BH
29.7	14.5	354.7	76.9	3.76	15.9	5.0	423	TL3-AH
68.4	60.6	4526.2	27.0	2.86	22.2	6.9	775	EL1-BH
19.0	11.1	3610.0	25.7	3.79	21.4	4.1	564	EL1-AH
54.5	67.5	444.7	118.0	3.46	24.4	5.5	705	EL3-BH
13.8	14.2	173.8	93.9	3.60	22.0	4.7	611	EL3-AH

* EW - מי קולחים, TL - נקז שפירים, EL - נקז קולחים, BH - לפני הומוניזציה, AH - אחרי הומוניזציה, nd - לא נבדק

5.4 אנליזת פרוטונים ¹H-NMR:

אנליזת ¹H-NMR בוצעה עבור דוגמאות חא"מ במקטע הגודל $0.45 < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$ לאחר הומוניזציה, (ע"מ לסלק יוני מתכת פאראמגנטים שעלולים להפריע באנליזה), וכמו כן בוצעה אנליזה למקטע הגודל $1 < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$. אינטגרציה של הפיקים נעשתה עפ"י הפיק של המימנים הארומטיים, שנרמל ל-1. סה"כ בוצעו 4 אינטגרציות (לא כולל הפיק של המים שנמצא ב-4.6 ppm). הספקטרה של דוגמאות החא"מ השונות, מרוכזים באיור 1. אזור ppm 0.5-2, מתייחס למימנים אליפטיים, אזור ppm 2-3, מתייחס למימנים ליד קבוצות מושכות אלקטרונים כגון אליליים, קרבוניל, קרבוקסיל, או טבעות ארומטיות. אזור ppm 3-4.6, מתייחס למימנים ליד חמצן כגון מתוקסי, כהל, אלדהיד, פנול וקרבוקסיל. אזור ppm 6.2-9, מתייחס למימנים על טבעות ארומטיות. ערכי האינטגרלים, והיחסים בין הקבוצות השונות, מרוכזים בטבלה 3.

טבלה 3: נתוני האינטגרציה עבור אנליזת $^1\text{H-NMR}$:

מקטע גודל	סימול הדוגמא*	מימנים אליפטים 0.5-2 ppm	מימנים ליד קב' מושכות אלק' 2-3 ppm	מימנים לחמן 3-4.6 ppm	מימנים ארומטיים 6.2-9 ppm	אליפטי ארומטי	מימנים ארומטי ליד קב' מושכות אלק'	מימנים ארומטי ליד חמץ
1kDa < מ"חא < 0.45μm	EW2	4.779	2.075	4.957	1	0.209	0.482	0.202
	EW4	3.164	1.467	4.256	1	0.316	0.682	0.235
	TL1	1.868	0.773	3.317	1	0.535	1.294	0.301
	TL3	1.621	0.791	1.610	1	0.617	1.264	0.621
	EL1	1.651	0.857	2.685	1	0.606	1.167	0.372
	EL3	1.301	0.820	1.810	1	0.769	1.220	0.552
200Da < מ"חא < 1kDa	EW2	3.434	1.425	1.634	1	0.291	0.702	0.612
	EW4	2.443	2.518	3.081	1	0.409	0.397	0.325
	TL1	2.905	0.849	1.197	1	0.344	1.178	0.835
	TL2	5.252	1.930	0.757	1	0.190	0.518	1.321
	TL3	10.640	4.886	2.417	1	0.094	0.205	0.414
	TL4	4.596	3.432	3.216	1	0.218	0.291	0.311
	EL1	2.156	0.873	0.590	1	0.464	1.145	1.695
	EL3	7.986	4.316	4.019	1	0.125	0.232	0.249

בחא"מ ממקטע הגודל $0.45\mu\text{m} < \text{חא} < 1\text{kDa}$, (איור 1 א'), נמצאו הבדלים בין מי הקולחים לבין מי הנקז משתי סוגי ההשקיות. חא"מ מנקז קולחים היה דומה בהרכבו לחא"מ מנקז שפירים. חא"מ ממי הקולחים נמצא יותר אליפטי מחא"מ משני סוגי הנקזים. כמו כן, ניתן לראות שחא"מ ממי הקולחים יותר הידרופילי ומכיל יותר קבוצות פולאריות מחא"מ משני סוגי הנקזים. תוצאות דומות נצפו ע"י Gigliotti וחובריי, (1997), לאחר שימוש בקומפוסט שהופק משפכים עירוניים במשך 6 שנים. בהשוואה בין חא"מ מקרקע שטופלה בקומפוסט, לבין חא"מ מהקומפוסט עצמו, נמצא שחא"מ מהקומפוסט היה יותר אליפטי, עם ריכוז מימנים גדול יותר ליד קבוצות מושכות אלקטרוניים (יותר פולארי), והכיל פחות מימנים ארומטיים. בחא"מ מקרקע שטופלה בקומפוסט, ריכוז המימנים האליפטיים ירד, וריכוז המימנים ליד קב' מושכות אלקטרוניים ואילו שליד חמץ עלה, לעומת חא"מ מקרקע ללא קומפוסט.

בחא"מ ממקטע הגודל $1\text{kDa} < \text{חא} < 200\text{Da}$, (איור 1 ב'), לא נמצאו הבדלים בין מי הקולחים לשני סוגי הנקזים, או בין נקז קולחים לנקז שפירים.

בהשוואה בין שני מקטעי הגודל, במקטע הגודל הקטן נמצא שעבור מי הקולחים הייתה עלייה בריכוז המימנים הארומטיים ביחס לריכוז המימנים האליפטיים. בניגוד לכך, עבור חא"מ משני סוגי הנקזים במקטע הגודל הקטן, נמצאה ירידה בריכוז המימנים הארומטיים ביחס לריכוז המימנים האליפטיים. כמו כן מקטע הגודל הקטן היה בעל פיקים מעט יותר ברורים, בעיקר בחלקו הארומטי. ניתן לומר שחא"מ במקטע הגודל הקטן שונה בהרכבו מחא"מ מהמקטע הגדול יותר.

5.5 אנליזת FTIR:

הספקטרה של דוגמאות החא"מ השונות, מרוכזים באיור 2. נתוני הפיקים המרכזיים שנמצאו ואפיונם מופיעים בטבלה 4. בכל דוגמאות החא"מ ובשני מקטעי הגודל, נמצא פיק רחב באזור $3400-3300\text{ cm}^{-1}$, (A), שמאפיין מימן הקשור לחמץ או לחנקן, וניתן להניח שבפיק זה ישנה גם תרומה מסוימת של מימן השייך למים שלא סולקו עד תום בתהליך הייבוש. משום כך לא נערכה השוואה של פיק זה בין דוגמאות החא"מ השונות.

טבלה 4: אפיון הפיקים המתקבלים מאנליזת FTIR

(עפ"י: (Silverstein et al., 1991; Solomon and Fryhle, 2004)

מיקום הפיק cm^{-1}	סימון הפיק	אפיון הפיק
פיק רחב $3400-3300$	A	מיתוח של O-H (כהל, פנול, מים או קב' קרבוטילית), או מיתוח N-H באמין
2940-2850	B	מיתוח C-H של CH_3 או CH_2 אליפטיים
1650-1620	C	$\text{C}=\text{C}$ אלקן או ארומטי, $\text{C}=\text{O}$ באלדהיד או קטון, COO^- קב' קרבוטילית
1400-1380	D	CH_2 או CH_3 , R-COO^-
1150-1090	E	C-O של כהל או פוליסוכרים

בחא"מ ממקטע הגודל $0.45\mu\text{m} < \text{חא} < 1\text{ kDa}$, (איור 2 א'), ניתן לראות הבדלים בין מי הקולחים לבין שני סוגי הנקזים. בחא"מ ממי הקולחים ניתן לראות תרומה דומה של פיקים E, C, בעוד שפיק D נמצא קטן יותר. במי הנקז משני סוגי ההשקיות, פיק C בעל תרומה רבה יותר מפיקים D ו-E. פיק E בעל תרומה נמוכה יותר מפיק C. מכך ניתן לומר שחא"מ משני סוגי הנקז במקטע גודל זה, הוא יותר ארומטי ופחות מחומצן מחא"מ ממי הקולחים.

בחא"מ ממקטע הגודל $1\text{ kDa} < \text{חא} < 200\text{ Da}$, (איור 2 ב'), נמצאו אותם פיקים אך תרומתם הייתה שונה. במקטע גודל זה נמצאה תרומה עיקרית של פיק E בכל סוגי החא"מ, כלומר במקטע גודל זה החא"מ יותר מחומצן מאשר במקטע הגדול יותר. במי הקולחים ישנה תרומה רבה יותר של פיק D, בעוד שבשני סוגי הנקזים תרומתו של פיק D קטנה יותר. בהשוואה בין מקטע גודל זה למקטע הגדול יותר, נצפתה ירידה בעצמת פיק B ובמרבית הדוגמאות לא ניתן היה לזהותו. מכאן ניתן לומר שחא"מ במקטע הגודל הקטן יותר מחומצן ופחות אליפטי מחא"מ במקטע הגדול. מי הקולחים נמצאו יותר אליפטים ומחומצנים בהשוואה למי הנקז במקטע גודל זה. מכיוון שכמות הפיקים אינו נעשה ע"י חישוב מדויק, ייתכנו טעויות בהערכת התרומה היחסית של כל פיק, אך באופן כללי ניתן לומר שהספקטרה שהתקבל דומה למדווח בספרות עבור חא"מ מהקרקע ומשפכים שונים.

בעבודה של Khalaf (2003), נבדקו מקטעי גודל שונים של חומצות הומיות שהופקו מהקרקע. בהשוואה בין חומצות הומיות במקטע הגודל $1-3\text{ kDa}$, לבין חומצות הומיות שלא עברו הפרדת גודל או חומצות הומיות לאחר סינון בפילטר $0.2\mu\text{m}$, ניתן היה לצפות בירידה בעצמת הפיק באזור $2920-2850\text{ cm}^{-1}$ שמציין מיתוח של CH_2 ו- CH_3 אליפטים, וכמו כן נצפתה עלייה בעצמת הפיק באזור $1400-1380$ המציין ויברציה של קבוצת R-COO^- . בשיילוב אנליזת ^{13}C , ^{19}F NMR ו-UV-VIS, נקבע שירידה בגודל המולרי גורמת לירידה בריכוז החומרים האליפטים, ולעלייה בפולאריות ובריכוז החומרים הארומטיים.

בחא"מ שהופק מהפסולת הנוזלית המתקבלת ממפעל לעיבוד עץ (עיבוד העץ ליצירת נייר או סיבי עץ לשימושים אחרים), מצאו Duarte וחבריו (2003), שירידה בגודל המולקולרי של החא"מ, הייתה מלווה בירידה בעצמת הפיקים באזור 1518 cm^{-1} ובאזור 1114 cm^{-1} . הפיק הראשון מציין קשר $\text{C}=\text{C}$ ארומטי (בדומה לפיק C בטבלה 4 שנמצא בתדירות נמוכה יותר), והפיק השני מציין קשר $\text{C}-\text{O}$ (בדומה לפיק E בטבלה 4). מסקנתם הייתה שחא"מ קטן מולקולרית מכיל ריכוז גבוה יותר של חומרים ארומטיים, מאשר חא"מ גדול מולקולרית.

מחקרים נוספים הראו שחא"מ מקומפוסט לאחר תקופות בישול שונות, (קומפוסט שעובר פירוק מיקרוביאלי בתנאים אירוביים, ע"מ לייצבו), הופך לפחות אליפטי ויותר ארומטי ומכיל פחות פוליסוכרים, (ירידה בעצמת הפיקים המסומנים בטבלה 4 באותיות E, B), (Chefetz et al., 1998; Hsu et al., 1999). בסקירה של Pulicino (2002), מצוין שחא"מ מקומפוסט לאחר בישול, דומה למעשה לחא"מ מהקרקע, מכיוון שבשני המקרים החא"מ עובר פירוק מיקרוביאלי שבסופו נותרים החומרים העמידים יותר (בעיקר חומרים ארומטיים).

5.6 אפיון פלוריסנצי תלת מימדי (EEM):

בשלב זה, נבנו מפות פלואורסצנטיות תלת ממדיות של חא"מ ללא תוספת נחושת, בריכוז פא"מ קבוע של 20 ppm , (איור 3). העירור נעשה בטווח אורכי גל של $210-590\text{ nm}$, והפליטה בטווח אורכי גל של $220-590\text{ nm}$. טבלה 5 מציגה חלוקה של המפה הפלואורסצנטית ל-5 אזורים המייצגים קבוצות חומרים שונות, עפ"י Chen וחבריו (2003). חלוקת המפה לאזורים אינה מוחלטת, ובעיקר ההפרדה בין חומרים דמויי חומצות הומיות, לחומרים דמויי חומצות פולביות. שני סוגי החומרים, מאופיינים באורכי גל לפליטה גבוהים

מ- 380 nm , אך אורכי הגל לעירור עשויים להשתנות בהתאם למקור החא"מ, (Coble, 1996; Her et al., 2003; Baker and Spencer, 2004). משום כך, הפיקים שזוהו באורכי גל לפליטה הגבוהים מ- 380 nm , אופיינו כחומרים הומיים, ללא הפרדה בין חומרים דמויי חומצות הומיות לחומרים דמויי חומצות פולביות.

טבלה 5: אפיון הפיקים במפה הפלואורסצנטית (Chen et al., 2003)

אפיון הפיקים	עירור nm	פליטה nm
חלבונים ארומטיים-1	200-250	280-330
חלבונים ארומטיים-2	200-250	330-380
חומרים דמויי חומצות פולביות	200-250	380-550
תוצרי פירוק מיקרוביאליים מסיסים	250-280	280-380
חומרים דמויי חומצות פולביות	>250	380-550

5.6.1 חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$:

באיור 3 א', מופיעות המפות הפלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ השונות במקטע גודל זה. הדמיון בין חא"מ ממי קולחים וחא"מ מנקז שפירים ומנקז קולחים, ניכר בנוכחות שני פיקים מרכזיים, עם עירור באורכי גל $260-280 \text{ nm}$, $330-335 \text{ nm}$ ופליטה באורכי גל $430-450 \text{ nm}$. פיקים פלואורסצנטים באורכי גל דומים דווחו בספרות עבור חא"מ ממקורות שונים, ומייצגים חומרים דמויי חומצות פולביות/ הומיות. יחד עם זאת, עצמת הפיקים הייתה גבוהה יותר בחא"מ ממי קולחים ומנקז קולחים, ויותר נמוכה בחא"מ מנקז שפירים. בנוסף לכך, נמצא ייחוד בולט עבור חא"מ ממי קולחים, שבו ניתן היה לראות פיק נוסף הממוקם בעירור של $274-283 \text{ nm}$ ובפליטה של $324-256 \text{ nm}$, וכמו כן נראה פיק נוסף, פחות ברור, ("כתף"), הממוקם בעירור באזור 250 nm ובפליטה באזור 360 nm . עפ"י טבלה 5, הפיקים הנ"ל מייצגים תוצרי פירוק מיקרוביאליים מסיסים וחלבונים ארומטיים, בהתאמה. תוצאות דומות נמצאו בספרות עבור חא"מ ממי קולחים ומבוצה, (Westerhoff et al., 2001; Chen et al., 2003). איור 4 א' מראה את מיקום הפיקים הפלואורסצנטים עבור דוגמאות חא"מ במקטע הגודל הנידון. הפיקים התרכזו באזורים דומים במפה הפלואורסצנטית (אזורים A, B, C). אזורים B ו-A, מייצגים חומרים דמויי חומצות הומיות/פולביות, ואזור C מייצג תוצרי פירוק מיקרוביאליים מסיסים. ניתן להבחין שהפליטה עבור חא"מ ממי קולחים, מתרחשת באורכי גל נמוכים יותר משני סוגי הנקזים. בין שני סוגי הנקזים, ניתן לראות שעבור חא"מ מנקז שפירים, הפליטה מתרחשת באורכי גל ארוכים יותר מהפליטה עבור חא"מ מנקז קולחים. איור 5 א' מציג מפות פלואורסצנטיות של החא"מ בתוספת ריכוז מרבי של נחושת (3.5 pCu). ניתן לראות שתוספת הנחושת גורמת לירידה בעצמת הפיקים, אך לא משנה את מיקומם במפה. ירידה בעצמת הפיקים הפלואורסצנטים בנוכחות נחושת, הינה צפויה, ומבטת מהיווצרות קומפלקס נחושת-חא"מ, שאינו פלואורסצנטי, (הרחבה בנושא זה מצויה בסעיף 5.7.2).

5.6.2 חא"מ במקטע גודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$:

במקטע גודל זה, זוהו פיקים הדומים במיקומם לפיקים שזוהו במקטע הגודל הקודם (איור 3 ב'). גם כאן נמצאו בכל דוגמאות החא"מ שני פיקים מרכזיים, עם עירור בטווח $245-265 \text{ nm}$, $320-340 \text{ nm}$ ופליטה בטווח $430-450 \text{ nm}$, המשויכים, לחומרים דמויי חומצות הומיות/פולביות. כמו כן, גם במקטע גודל זה, זוהו פיקים נוספים בחא"מ ממי קולחים: פיק בולט בעירור $270-280 \text{ nm}$ ופליטה $300-320 \text{ nm}$, ו"כתף" נוספת עם עירור באזור 220 nm ופליטה באזור 310 nm , ששויכו כאמור לתוצרי פירוק מיקרוביאליים מסיסים ולחלבונים ארומטיים, בהתאמה. עצמת הפיקים בדוגמאות של שני סוגי הנקזים, הייתה גבוהה מעצמתם במקטע הגודל הקודם. הדבר מציין שחא"מ קטן מולקולרית בנקזים, מכיל יותר קבוצות פלואורסצנטיות מחא"מ גדול מולקולרית. בחא"מ ממי קולחים, לא נצפה הבדל בעצמת הפיקים בין שני מקטעי הגודל. איור 4 ב' מציג את מיקום הפיקים הפלואורסצנטים עבור חא"מ במקטע הגודל הנידון. במי קולחים, הפיק המשוך לחומצות הומיות/פולביות (A), נמצא בעירור באורכי גל נמוכים יותר משני סוגי הנקזים. הפיק המשוך לחומצות הומיות/פולביות (B), נמצא בפליטה באורכי גל נמוכים יותר בחא"מ ממי קולחים מאשר בחא"מ משני סוגי הנקזים. גם במקטע גודל זה, לא נצפה שינוי במפה הפלואורסצנטית של החא"מ בתוספת ריכוז נחושת מרבי (איור 5 ב').

על סמך הדמיון הרב בין חא"מ מנקז שפירים, לבין חא"מ מנקז קולחים (למעט הבדל בעצמת הפיקים בחא"מ ממקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$), ניתן לומר שישנן קבוצות פלואורסצנטיות דומות בשני סוגי הנקזים. לעומת זאת, חא"מ ממי קולחים מכיל קבוצות פלואורסצנטיות שאינן מצויות בחא"מ משני סוגי הנקזים, ולכן באופן כללי ניתן לומר שחא"מ זה שונה בתכונותיו הפלואורסצנטיות, ועקב כך שונה בהרכבו מחא"מ משני סוגי הנקזים. זוהי תמיכה נוספת בנתונים שהתקבלו מאנליזת $^1\text{H-NMR}$ ואנליזת FTIR.

5.7 אפיין האינטראקציות בין חא"מ לנחושת:

5.7.1 איזותרמות קשירה בין חא"מ לנחושת:

מהלך הטיטרציה מתואר בפרק חומרים ושיטות. דוגמאות חא"מ ממי קולחים ומשני סוגי הנקזים, (במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$ לפני ואחרי הומיוניזציה, ומקטע גודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$), טוטרו בעזרת תמיסת נחושת בריכוזים עולים, ($9-3 \text{ pCu}_{\text{total}}$), כך שריכוז הנחושת החופשית נמדד בטווח $7-3 \text{ pCu}$. איזותרמת הקשירה בין החא"מ לנחושת, מתוארת כריכוז הנחושת הקשורה ליחידת משקל של פא"מ (mol/kg DOC), כתלות בריכוז הנחושת החופשית (mol/L). איזותרמות הקשירה מוצגות באיור 6. מקדם החלוקה K_d , המציין את היחס בין ריכוז הנחושת הקשורה ליחידת משקל של פא"מ (מול/ק"ג פא"מ) לבין ריכוז הנחושת החופשית בתמיסה (מול/ל), כתלות בריכוז הנחושת הקשורה (מול/ק"ג פא"מ), מוצג באיור 7. במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, ריכוז הנחושת הקשורה עבור חא"מ ממי קולחים, נקז שפירים ונקז קולחים, הייתה בטווחים: $0.18-3.25$, $2.58-7.20$, $1.58-2.48$ מול/ק"ג פא"מ, בהתאמה. הסטיות בין דוגמאות החא"מ היה גבוהות, אך עדיין ניתן להבחין שחא"מ מי קולחים קשר פחות נחושת בהשוואה לשני סוגי הנקזים, ומקדמי החלוקה עבור מי קולחים היו נמוכים מ- 10^6 ק"ג/ליטר, בעוד שחא"מ

מנקדים, היה עם מקדמי חלוקה גבוהים יותר (10^6 - 10^7). ההבדלים בין חא"מ משני סוגי הנקדים, היו קטנים, אך עדיין ניתן היה להבחין שחא"מ מנקז קולחים קשר יותר נחושת מאשר חא"מ מנקז קולחים. באותו מקטע גודל לאחר הומיוניזציה, נמצא גם שחא"מ ממי קולחים קשר פחות נחושת מחא"מ משני סוגי הנקדים. במקרה זה, לא נמצאו הבדלים בולטים בין שני סוגי הנקדים. לאחר הומיוניזציה, ריכוז הנחושת הקשורה עבור חא"מ מי קולחים, נקז שפירים ונקז קולחים הייתה בטווח 0.17-0.35, 0.53-0.71, 0.55-0.81 מול/ק"ג פא"מ, בהתאמה. איזותרמות הקשירה עבור חא"מ במקטע זה, לאחר הומיוניזציה, מראות התנהגות לא אופיינית בריכוזי נחושת גבוהים. ירידה של איזותרמת הקשירה בריכוזי נחושת גבוהים (pCu 4.5), יכולה להיות מוסברת כשגיאה בקריאות האלקטרודה בריכוזים אלו. הבדלים קטנים בין ריכוז הנחושת הכללי, לריכוז הנחושת החופשית שנמדד בעזרת האלקטרודה, גורמים לשגיאות גדולות בריכוז הנחושת הקשורה. כמו כן, מכיוון שבריכוזי נחושת גבוהים, קבוצות קושרות בחא"מ רוויות בנחושת, ייתכן שהאלקטרודה "קוראת" חלק מהנחושת הקשורה ומתייחסת אליה כנחושת חופשית.

בתהליך ההומיוניזציה, נתון מחליף אתרים קושרים בחא"מ, שמאכלסים במתכות אחרות. ההרוויה בנתרן, יכולה לשנות גם את המבנה המרחבי של החא"מ. ייתכן שהשינוי במבנה המרחבי, גורם לפחות אתרים בחא"מ להיות זמינים לקשירת נחושת ולכן חא"מ שעבר הומיוניזציה, קושר פחות נחושת מחא"מ שלא עבר את התהליך. סיבה נוספת לקשירה נמוכה יותר של נחושת, בחא"מ אחרי הומיוניזציה, יכולה להיות קשורה לאיבוד מרכיבים קושרי נחושת בתהליך. עפ"י ריכוז פא"מ לפני ואחרי הומיוניזציה, (טבלה 2), אכן ניתן לראות שהיה איבוד פא"מ בתהליך. הפא"מ שאבד בתהליך, היה קטן מולקולרית, (<200 Da). תכונות הקשירה של חא"מ בגודל זה לנחושת, או מתכות אחרות, לא נמצאו בספרות, אך ידוע שחא"מ קטן מולקולרית, בעל יכולת קשירה גבוהה יותר מחא"מ גדול מולקולרית, (Han and Thompson, 1999). איזותרמות הקשירה עבור חא"מ קטן מולקולרית במחקרים, $1\text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200\text{ Da}$, הראו קשירה נמוכה יותר לנחושת מחא"מ גדול מולקולרית, $0.45\text{ }\mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1\text{ kDa}$, ולא נמצאו הבדלים בין חא"מ מהמקורות השונים. ייתכן שהסיבה לכך היא שוב איבוד של מרכיבים קטנים (<200 Da), שנשטפו במהלך הפרדת הגודל.

מחקרים רבים תארו את ההשפעה של שימוש בבוצה ודשנים מוצקים, על התנהגות נחושת ומתכות אחרות בקרקע. בניסוי הדגרה (3, 7 שנים), של קרקעות ישראליות שטופלו בבוצה שפכים, (Oliver et al, 2005; הס, 2002), נמצא שהתפלגות המתכות (Cu, Ni, Cd, Pb, Zn), בקרקעות לאחר שימוש בבוצה 3-5 שנות הדגרה, הייתה אופיינית לקרקעות עצמן, למרות תוספת כמות גדולה של הבוצה לקרקע. הזמינות והמסיסות של מרבית המתכות, לא עלו במהלך ההדגרה למרות ירידה בריכוז הפחמן האורגני, שמיוחסת לביודגרציה. ריכוז הנחושת החופשית נותר ללא שינוי לאחר הדגרה בת 7 שנים, המסקנה מכך הייתה שתוספת בוצה לקרקע, אינה משפיעה על מסיסות וזמינות של נחושת, ואינה מהווה סכנה סביבתית.

גם Bolan וחבריו, (2003), מצאו שתוספת בוצה לקרקעות מצפון ניו-זילנד, גרמה לירידה בריכוז ה-Cd המסיס והחליף בקרקע (Cd^{2+} חופשי בתמיסה), ולעלייה בריכוז ה-Cd הקשור לחומרים אורגניים. הרעילות של Cd לצמחייה לאחר תוספת בוצה ירדה, מפני שריכוז המתכת החופשית הזמינה בקרקע, ירדה. בהשוואה בין חא"מ מקרקעות, לחא"מ שהופק מפסולת חוות חזירים, (Businelli et al, 1999), נמצא שקשירת נחושת בחא"מ מפסולת החזירים, הייתה ברמה דומה לקשירה של חומצות הומיות מחא"מ בקרקע. חומצות פולביות מהקרקע, לעומת זאת, הראו קשירה גבוהה יותר. ההסבר לתופעה נקשר לריכוז קבוצות קרבוקסיליות בחא"מ, שאחריות על קשירת נחושת, ומצויות בריכוזים גבוהים יותר בחומצות פולביות.

במחקרים קודמים, מי הקולחים שנבדקו היו לרוב באיכות נמוכה. קולחים באיכות נמוכה, מכילים ריכוז גבוה יותר של חא"מ ומתכות, מקולחים באיכות גבוהה (שבהם נעשה שימוש במחקר זה). השימוש בקולחים באיכות נמוכה, נמצא כגורם מזרז של הנעת מתכות כבדות בקרקע, כתוצאה מהיווצרות קומפלקסים אורגניים מסיסים, שתנועתם בקרקע גבוהה. נמצא שבהשקיה במי קולחים באיכות נמוכה במקסיקו, הייתה עלייה בריכוז הפחמן האורגני הכללי והמסיס, בשכבות העליונות של הקרקע, ונצפה זירוז בהנעת מתכות כבדות בקרקע, (Siebe and Fischer, 1996). במחקר דומה למחקר הנוכחי (ניסוי לזימטרים), (Fine et al, 2005), נמצא שבקרקעות חוליות שטופלו בבוצה או במי קולחים מאיכות בינונית, הייתה דליפה מזערית של נחושת בקרקע. נקזים מליזימטרים שהושקו במי קולחים, לעומת אילו שהושקו במים שפירים, הכילו ריכוז דומה של נחושת. השקיה במי קולחים באיכות גבוהה, כפי שנעשה במחקר, אינה גורמת להגדלת הקשירה של החא"מ לנחושת בקרקע. ככל הנראה, השקיה מבוקרת (גירעונית), מאפשרת פעילות מיקרוביאלית בקרקע המושקית וגורמת לביודגרציה של החא"מ. כתוצאה מפירוק מיקרוביאלי, לאחר זמן השהות של מי הקולחים בקרקע, הם מאבדים מאפיינים הייחודי, והופכים לדומים יותר לחא"מ בקרקע. משום כך לא נמצא הבדל בין הנקזים שהתקבלו לאחר השקיה במים שפירים, לעומת הנקזים שהתקבלו לאחר השקיה במי קולחים.

5.7.2 אפיון משולב של החא"מ

האפיון המשולב כלל שימוש בשיטת האלקטרודה הספציפית, ובנוסף בשיטת הדיכו הפלואורסצנטי (FQ). מנתוני האלקטרודה הספציפית נמצא ריכוז הנחושת החופשית, וחושב הריכוז של הנחושת

הקשורה לחא"מ. בשיטת הדיכוי הפלואורסצנטי, נמצאה הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה, כתוצאה מתוספת נחושת בריכוזים עולים. ראשית נבדקו דוגמאות החא"מ ללא תוספת נחושת ונקבעו אורכי הגל לעירור ופליטה שבהם התקבלה עצמת הפלואורסצנטיה המרבית. אורכי הגל לעירור ופליטה, שנמצאו עבור דוגמאות חא"מ ללא נחושת, מוצגים בטבלה 6. גרף של עירור כנגד פליטה, מוצג באיור 8, עבור חא"מ משני מקטעי הגודל, ובשני אורכי הגל לעירור. לא היה ניתן להבחין בהבדלים בין סוגי החא"מ השונים.

עצמת הפלואורסצנטיה של חא"מ ללא תוספת נחושת, המנומלת לריכוז הפא"מ, מוצגת באיור 9, (לאחר תיקון IFE המוסבר בפרק חומרים ושיטות). בשני מקטעי הגודל, לא נמצאו הבדלים בין החא"מ מהדוגמאות השונות. תוספת נחושת לחא"מ, גרמה לירידה בעצמת הפלואורסצנטיה, שמיוחסת להיווצרות קומפלקס חא"מ-נחושת, שאינו פלואורסצנטי (איור 10).

דיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה של חא"מ ממקורות טבעיים, בנוכחות יוני נחושת, ידוע מהספרות, (Akagi and Zsolnay, 2005; Dudal et al., 2005). במרבית המחקרים, עיבוד הנתונים נעשה תוך שימוש במודלים, ובהסתמך על הנתונים המתקבלים משיטת הדיכוי הפלואורסצנטי, חושבו פרמטרים כגון מקדמי קשירה ודרגת הקומפלקסציה.

באנליזה שבוצעה עבור חומצות הומיות מאגמים ונהרות, (Cabaniss and Shuman, 1986, 1988), החוקרים ציינו שהשימוש בשיטת הדיכוי הפלואורסצנטי, להערכת אופי הקשירה של חא"מ לנחושת, אינה מספקת. הם טענו שההשערות שנערכו בעבודות קודמות, מהוות מקור לשגיאות רבות ולכן הציעו את השימוש באלקטרודת נחושת ספציפית לקביעת ריכוז הנחושת הקשורה. גם במחקר זה, לא נעשה שימוש במודלים, ועיבוד הנתונים עבור הדיכוי הפלואורסצנטי, נעשה בשילוב הנתונים המתקבלים מסיטרציה של חא"מ עם נחושת. גרפים של עצמת הפלוריסצנציה היחסית (F/F_0), כתלות בריכוז הנחושת הקשורה, מוצגים באיור 11. נמצא כי הדיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה עבור חא"מ ממי קולחים, נמוך הרבה יותר מהדיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה עבור חא"מ משני סוגי הנקזים. מכך ניתן להסיק שחא"מ ממי קולחים, קושר נחושת על אתרים שאינם פלואורסצנטיים, או בסביבה פחות פלואורסצנטית, לעומת חא"מ ממי נקז שאתרי הקשירה שלו לנחושת, הם בעיקר פלואורסצנטיים. בספרות לא נמצאו עבודות המשוות בין דיכוי פלואורסצנטי של חא"מ מקולחים לעומת חא"מ מהקרקע, אך Reynolds and Ahmad (1995), מצאו 40% דיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה, עבור חא"מ ממי שפכים, בנוכחות 0.2 מ"ג/ליטר של Cu^{2+} או Ni^{2+} . חא"מ משפכים מטופלים לעומת זאת, לא הראה דיכוי משמעותי בעצמת הפלואורסצנטיה בנוכחות מתכות אילו.

טבלה 6: אורכי גל לעירור ופליטה עבור חא"מ ללא נחושת

מקטע גודל	סוג הדוגמא	סימול הדוגמא*	$\lambda_{\text{excitation}}$ nm	$\lambda_{\text{excitation}}$ nm	$\lambda_{\text{emission}}$ nm
$1\text{kDa} < \text{חא} < 0.45\mu\text{m}$	מי קולחים-1	EW1	277	340	450
	מי קולחים-2	EW2	274	341	439
	מי קולחים-4	EW4	274	338	449
	נקז שפירים-1	TL1	260	342	450
	נקז שפירים-2	TL2	261	331	449
	נקז שפירים-3	TL3	260	334	450
	נקז שפירים-4	TL4	267	336	442
	נקז קולחים-1	EL1	266	337	445
	נקז קולחים-2	EL2	283	336	440
	נקז קולחים-3	EL3	271	337	450
	נקז קולחים-4	EL4	278	338	450
	מי קולחים-2	EW2	246	331	440
	מי קולחים-4	EW4	250	342	447
	נקז שפירים-2	TL2	250	325	450
	נקז שפירים-4	TL4	258	329	440
	נקז קולחים-1	EL1	254	331	440
	נקז קולחים-3	EL3	251	331	439
$200\text{Da} < \text{חא} < 1\text{kDa}$					

* EW-Effluent Water, TL-Tap Water Leachate, EL-Effluent Water Leachate

חא"מ ממי קולחים נחשב ליותר אליפטי בהשוואה לחא"מ מהקרקע. כך ניתן להסביר את השוני בדיכוי הפלואורסצנטי. קבוצות אליפטיות בחא"מ ממי קולחים יכולות לקשור נחושת או מתכות אחרות, אך בהשוואה לחא"מ מהקרקע, הקשירה למתכות פחותה. חא"מ מהקרקע ידוע כיותר ארומטי ומשום כך מכיל יותר קבוצות בעלות אפניות גבוהה למתכות, ולכן צפוי דיכוי חזק יותר בעצמת הפלואורסצנטיה עבורו.

6. סיכום ומסקנות:

בהשקיה גירעונית במי קולחים שניוניים, לא נמצאה עלייה בריכוז החא"מ בקרקע. ריכוז החא"מ שהופק מנקזים שהושקו במי קולחים שניוניים, לא היה שונה מריכוז החא"מ שהופק מנקזים שהושקו במים שפירים. בממד לריכוז חומרים ארומטיים בחא"מ ($\text{SUVA } 256 \text{ nm}$), נמצאו הבדלים בין שלושת סוגי החא"מ, כאשר במי הקולחים ריכוז החומרים הארומטיים היה הנמוך ביותר. בחא"מ שהופק מנקזים של השקיה במי קולחים, נמצא ריכוז נמוך יותר של חומרים ארומטיים, בהשוואה לחא"מ שהופק מנקזים של השקיה במים שפירים.

בהפרדת החא"מ למקטעי גודל, נמצא שמרבית החא"מ מצוי במקטע הקטן מ- 1 kDa . הרווית החא"מ בנתרן, (הומיוניזציה), במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, גרמה לאיבוד של 2-19% של פא"מ, אך יחד עם זאת נצפתה ירידה בריכוז המתכות הכבדות לאחר התהליך. תהליך ההרוויה בנתרן, שיפר באופן משמעותי את הספקטרה שהתקבל באנליזת $^1\text{H-NMR}$, ואפשר ניתוח יותר מעמיק שלו. הנתונים שהתקבלו מאנליזת $^1\text{H-NMR}$, הראו שבמקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, חא"מ ממי קולחים היה יותר אליפטי ויותר מחומצן. חא"מ מנקז קולחים ומנקז שפירים, נמצא יותר ארומטי ופחות מחומצן.

במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, ניתן היה לראות פיקים ברורים יותר, בעיקר באזור המיוחס למינים ארומטיים ($6.2-9 \text{ ppm}$). ניתן לומר שמקטע גודל זה מכיל מבנים פשוטים יותר של החומרים האורגנים בחא"מ. במקטע גודל זה, לא נמצאו הבדלים בין החא"מ משלושת סוגי המים. הסיבה לכך יכולה להיות קשורה לנוכחות מלחים שגורמים ל"רעש" בספקטרום ולכן האינטגרציה של הפיקים הופכת לפחות מדויקת.

בהשוואה בין שני מקטעי הגודל, נמצאה עלייה ביחס המינים ארומטי/אליפטי עבור חא"מ ממי הקולחים, בעוד שעבור חא"מ משני סוגי הנקזים הייתה ירידה ביחס זה. מכאן ניתן לומר שבמקטע הגודל הקטן, חא"מ ממי הקולחים הפך ליותר ארומטי ופחות אליפטי, ואילו חא"מ ממי הנקז, הפך ליותר אליפטי ופחות ארומטי. הנתונים שהתקבלו מאנליזת FTIR, עבור מקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, נתנו הוכחה נוספת לכך שחא"מ ממי קולחים הינו פחות ארומטי ויותר מחומצן, מחא"מ משני סוגי הנקזים. במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, החא"מ משלושת סוגי המים היה פחות אליפטי ויותר מחומצן. בהשוואה בין חא"מ ממי קולחים לחא"מ מהנקזים, נמצא שהראשון יותר אליפטי. במקרה זה ישנה סתירה לנתונים שהתקבלו באנליזת $^1\text{H-NMR}$, אך חשוב לציין שאנליזת FTIR, יכולה להיות פחות מדויקת מכיוון שראשית אנליזה זו אינה כמותית וכמו כן, פיקים במיקומים שונים מאפיינים את אותן הקבוצות הפונקציונאליות (פיקים D, B בטבלה 4).

המפות הפלואורסצנטיות התלת ממדיות, הראו הבדלים בולטים בין מי הקולחים, לבין שני סוגי הנקזים. גם במקרה זה לא נמצאו הבדלים בין נקז ממי הקולחים לנקז המים השפירים. חא"מ ממי הקולחים הראה נוכחות של קבוצות פלואורסצנטיות שלא נמצאו בחא"מ משני סוגי הנקזים. הקבוצות הפלואורסצנטיות הנוספות יוחסו לחומרי פירוק מיקרוביאליים מסיסים ולחלבונים ארומטיים פשוטים. בריכוז מרבי של נחושת, עצמת הפיקים הפלואורסצנטיים ירדה, אך לא נמצאו שינויים משמעותיים במיקומם במפה.

קשירת החא"מ לנחושת במקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$, לפני ואחרי הומיוניזציה, הייתה נמוכה יותר עבור מי הקולחים, וגבוהה יותר בשני סוגי הנקזים. חא"מ ממי קולחים, שהינו פחות ארומטי מחא"מ משני סוגי הנקזים, יכול לקשור פחות נחושת מכיוון שהינו פחות פעיל.

לפני הומיוניזציה, חא"מ מנקז שפירים קשר יותר נחושת מאשר חא"מ מנקז קולחים. ההסבר לתופעה קשור גם כן לכך שחא"מ מנקז שפירים נמצא יותר ארומטי מחא"מ מנקז קולחים ולכן יותר פעיל ובעל קבוצות זמינות יותר לקשירת נחושת.

לאחר תהליך ההרוויה בנתרן, החא"מ משלושת הסוגים, (מי קולחים, נקז קולחים ונקז שפירים), הראה קשירה נמוכה יותר לנחושת, מאשר החא"מ שלפני ההרוויה בנתרן. יתכן שלאחר תהליך ההרוויה בנתרן, המבנה המרחבי של החא"מ משתנה, כך שהזמינות של הקבוצות הקושרות לנחושת, קטנה. ההרוויה בנתרן "פותחת" את המבנה הסבוך של החא"מ. נחושת שמוספת לחא"מ יכולה ליצור קשרים פולידינטיים, כלומר להיקשר בו זמנית ליותר מקבוצה פונקציונאלית אחת. במקרה זה כמות הנחושת שנקשרת לחא"מ נמוכה יותר, בהשוואה לחא"מ שאינו רווי בנתרן. יצירת קשרים פולידינטיים של הנחושת, יכולה לגרום לחא"מ להיות בעל מבנה מרחבי צפוף יותר, וכך אתרים קושרים בחא"מ הופכים לפחות זמינים לקשירת נחושת נוספת.

עבור חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$, לא נמצאו הבדלים בין הנקזים ומי הקולחים. כמו כן חא"מ במקטע גודל זה קשר פחות נחושת ממקטע הגודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$. ייתכן שהחא"מ שאבד בתהליך ההפרדה למקטע גודל זה, גרם לירידה בריכוז הקבוצות הפונקציונאליות שיכולות לקשור נחושת. בתוספת נחושת, נצפתה ירידה בעצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ. הדבר נובע מיצירת קומפלקס שאינו פלואורסצנטי, בין קבוצות קושרות בחא"מ לבין נחושת. הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה הייתה תלולה יותר עבור חא"מ משני סוגי הנקזים, בעוד שעבור חא"מ ממי הקולחים הירידה הייתה מתונה הרבה יותר. מכך

ניתן ללמוד שחא"מ ממי הקולחים קושר נחושת באתרים שונים מאילו של החא"מ בנקזים. בחא"מ ממי הקולחים, הנחושת נקשרת בעיקר באתרים שאינם פלואורסצנטיים, או באתרים שאינם קרובים לסביבה פלואורסצנטית, ומשום כך קשירת הנחושת אינה בעלת השפעה משמעותית על עצמת הפלואורסצנטיה של החא"מ. בחא"מ משני סוגי הנקזים, הנחושת נקשרת בעיקר באתרים פלואורסצנטיים, ולכן הירידה בעצמת הפלואורסצנטיה, הנבעת מקשירת נחושת, הינה חזקה הרבה יותר. לא היה ניתן להבדיל בין שני סוגי הנקזים, למרות ההשקיה בסוגי מים שונים. ההיפותזה שעליה התבססה עבודה זו הוכחה כנכונה. השקיה במי קולחים שניוניים, לא הייתה שונה מהשקיה במים שפירים. ההשקיה הגירעונית, גרמה לשהייה ממושכת של מי הקולחים בקרקע, וככל הנראה אפשרה פירוק מיקרוביאלי של החא"מ. האנליזות השונות, לא הראו הבדלים בין חא"מ שהופק מנקזים לאחר השקיה במי קולחים, לעומת חא"מ שהופק מנקזים לאחר השקיה במים שפירים. מי הקולחים, איבדו את תכונותיהם הייחודיות, לאחר שהייה בקרקע.

References

- הס אמיר, 2002. התפלגות כימית של מתכות כבדות בקרקעות מטופלות בבוצת שפכים. האוניברסיטה העברית בירושלים, הפקולטה לחקלאות רחובות.
- Akagi, J., Zsolnay, A., 2005. Relationships between DOM's quality and its interaction with copper. *Geophysical Research Abstracts*, Vol. 7, 01588.
- Baker, A., Spencer, R.G.M., 2004. Characterization of dissolved organic matter from source to sea using fluorescence and absorbance spectroscopy. *Science of the Total Environment* 333, pp 217-232
- Bolan, N.S., Adriano, D.C., Duraisamy, P., Mani, A., 2003. Immobilization and phytoavailability of cadmium in variable charge soils. III. Effect of biosolid compost addition. *Plant and Soil* 256, pp 231-241
- Businelli, M., Altieri, R., Giusquiani, P.L., Gigliotti, G., 1999. Complexation capacity of dissolved organic matter from pig slurry: a gel filtration and dialysis study. *Water, Air, and Soil Pollution* 113, pp 385-394
- Cabaniss, S.E., Shuman, M.S., 1986. Combined ion selective electrode and fluorescence quenching detection for copper-dissolved organic matter titrations. *Anal. Chem.* 58, pp 398-401
- Cabaniss, S.E., Shuman, M.S., 1988. Fluorescence quenching measurements of copper-fulvic acid binding. *Anal. Chem.* 60, pp 2418-2421
- Chefetz, B., Hadar, Y., Chen, Y., 1998. Dissolved organic carbon fraction formed during composting of municipal solid waste: properties and significance, *Acta hydrochim. hydrobiol.* 26, pp 172-179
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J.A., and Booksh, K., 2003. Fluorescence excitation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolve organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 37, pp 5701-5710
- Chin, Y.P., Aiken, G., O'Loughlin, E., 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol.* 28, pp 1853-1858
- Coble, P.G., 1996. Characterization of marine and terrestrial DOM in seawater using excitation-emission matrix spectroscopy. *Marine Chemistry* 51, pp 325-246

- Duarte, R.M.B.O., Santos, E.B.H., Duarte, A.C., 2003. Spectroscopic characteristics of ultrafiltration fractions of fulvic and humic acids isolated from an eucalyptus bleached Kraft pulp mill effluent. *Water Research* 37, pp 4073-4080
- Dudal, Y., Sévenier, G., Dupont, L., Guillon, E., 2005. Fate of the metal-binding soluble organic matter throughout a soil profile. *Soil Science* 170, pp 707-715
- Fiedler, S., Kalbitz, K., 2003. Concentration and properties of dissolved organic matter in forest soils as affected by the redox regime. *Soil Science* 168, pp 793-801
- Fine, P., Atzmon, N., Adani, F., Hass, A., 2005. Disposal of sewage effluent and biosolids in *Eucalyptus* plantations: a lysimeter simulation study. Twardowska I, and Tel-Or E. (Eds), Nato Programme Security Through Science, "Viable Methods of Soil and Water Pollution Monitoring, Protection and Remediation". Krakow (Poland), June 27 - July 01
- Fine, P., Hass, A., Prost, R., Atzmon, N., 2002. Organic carbon leaching from effluent irrigation lysimeters as affected by residence time. *Soil Science Society of American Journal* 66, pp 1531-1539
- Gautier, T.D., Shane, E.C., Guerin, W.F., Seitz, W.R., Grant, C.L., 1986. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materialst. *Environ.Sci.Tecnol.* 20, pp 1162-1166
- Gélinas, Y., Baldock, J.A., Hedges, J.I., 2001. Demineralization of marine and freshwater sediments for CP/MAS ^{13}C NMR analysis. *Org. Geochem.* 32, pp 677-693
- Gigliotti, G., Giusquiani, P.L., Businelli, D., Macchioni, A., 1997. Composition changes of DOM in the soil amended with municipal waste compost. *Soil Science* 162, pp 919-926
- Guo, M., Chorover, J., 2003. Transport and fractionation of dissolved organic matter in soil columns. *Soil Science* 168, pp 108-118
- Han, N., Thompson, M.L., 1999. Copper-binding ability of dissolved organic matter derived from anaerobically digested biosolids. *J. Environ. Qual.* 28, pp 939-944
- Her, N., Amy, G., McKnight, D., Sohn, J., Yoon, Y., 2003. Characterization of DOM as a function of MW by fluorescence EEM and HPLC-SEC using UVA, DOC, and fluorescence detection. *Water Research* 37, pp 4295-4303
- Hsu, J. H., Lo, S. L., 1999. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of pig manure. *Environmental Pollution* 104, pp 189-196
- Imai, A., Fukushima, T., Matsushige, K., Kim, Y.-H., Chio, K., 2002. Characterization of dissolved organic matter in effluents from wastewater treatment plants. *Water Research* 36, pp 859-870
- Khalaf, M., 2003. Effect of the fractionation and immobilization on the sorption properties of humic acid. Institute of Chemistry and Dynamics of the Geosphere IV, Agrosphere, Research Center Jülich, Germany
- Manka, J., Rebhun, M., Mandelbaum, A., Bortinger, A., 1974. Characterization of Organics in Secondary Effluents. *Environmental Science & Technology* 8, pp 1017-1020
- Oliver, I.W., Hass, A., Merrington, G., Fine, P., McLaughlin, M.J., 2005. Copper availability in seven israeli soils incubated with and without biosolids. *J. Environ. Qual.* 34, pp 508-513
- Peschel, G., Wildt, T., 1988. Humic substances of natural and anthropogeneous origin. *Water Research* 22, pp 105-108

- Pullicino, D.S., 2002. Chemical and spectroscopic analysis of organic matter transformations during composting of municipal solid waste: a review. Department of Chemistry at the University of Malta.
- Reynolds, D.M., Ahmad, S.R., 1995. The effect of metal ions on the fluorescence of sewage wastewater. *Water Res.* 29, pp 2214-2216
- Saadi, I., Borisover, M., armon, R., Laor, Y., 2006. Monitoring of effluent DOM biodegradation using fluorescence, UV and DOC measurements. *Chemosphere* 63, pp 530-539
- Sauve, S., McBride, M.B. and Hendershot, W.H. 1995. Ion-selective electrode measurments of copper (2^+) activity in contaminated soils. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 29, pp 373-379
- Siebe, C., Fischer, W.P., 1996. Effect of long-term irrigation with untreated sewage effluents on soil properties and heavy metal absorption of Leptosols and Vertisols in Central Mexico. *Z. Pflanzenernaehr. Bodenkd.* 159, pp 357-364
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C., Morrill, T.C., 1991. Spectrometric identification of organic compounds, 5th Edition. John Wiley and Sons, Inc., USA
- Solomon, T.W.G., Fryhle, G.B., 2004. Organic Chemistry, 8th Edition. John Wiley & Sons, Inc., USA
- Traina, S.J., Novak, J., Smeck, N.E., 1990. An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.* 19, pp 151-153
- Westerhoff, P., Chen, W., Esparza, M., 2001. Fluorescence analysis of a standard fulvic acid and tertiary treated wastewater. *J. Environ. Qual.* 30, pp 2037-2046
- Zumstein J. and Buffle J. (1989) Circulation of pedogenic and aquagenic organic matter in a eutrophic lake. *Water Res.* 23, pp 229-239

סיכום עם שאלות מנחות

מסי מחקר : 301-0380-02

1. <u>מטרות המחקר לתקופת הדו"ח תוך התייחסות לתוכנית העבודה.</u>
(1) הפקת חא"מ מליזימטרים מושקים במי-קולחים והפרדתם למקטעי גודל
(2) איפיון החא"מ ב-ISE ובשילוב ספקטרופלורומטריה
(3) בדיקת החא"מ ב- ¹ H-NMR וב-FTIR
(4) אפיון החא"מ ע"י מיפוי ספקטרופלורומטרי תלת מימדי (EEM)
2. <u>עיקרי הניסויים והתוצאות שהושגו בתקופה אליה מתייחס הדו"ח.</u>
(1) העתקת העצים לליזימטרים חדשים
(2) הפקת חא"מ לאחר השקיה גרעונית ממושכת, הפרדת החאמ למקטע גדול מ 1 ק"ד וקטן ממנו. ברכישה נמצא תא סינון, שיאפשר (א) הפרדת חא"מ למקטעים קטנים מ 1 ק"ד, (ב) הסרת יסודות קורט מהחא"מ (מונו-יוניציה) לשם ניסויי קשירת מתכות ולאנליזה ספקטרלית ב NMR.
(3) בוצעו טיטרציות בתחום רחב של pCu ובתחום פחות רחב נערכו ניסויים באלקטרודה בשילוב פלוריסנציה.
(4) בוצעו אנליזות ¹ H-NMR ו-FTIR
(5) בוצע מיפוי פלואורסצנטי תלת מימדי (EEM)
3. <u>המסקנות המדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו.</u>
(1) כושר הקשירה של חא"מ ממי הקולחים המקוריים לנחושת נמוך מזה של החא"מ משני סוגי הנקזים. הדבר מצביע על שינוי החא"מ במהלך שהותו בקרקע וריכוזו.
(2) אתרי הקשירה לנחושת בחא"מ ממי הקולחים המקוריים נמצאו פחות פלוריסנטיים מאתרי הקשירה בחא"מ משני סוגי הנקזים. שוב ניתן לייחס זאת לשינויים המתרחשים בזמן השהות בקרקע.
(3) ספקטרום הפרוטונים מראה נוכחות גבוהה יותר של חומרים ארומטיים בנקזים של מי הקולחים לעומת נקזים של מים שפירים. כמו כן, חא"מ ממי הקולחים נמצא יותר פולארי ומחומצן, מחא"מ מהנקזים.
(4) ספקטרום ה-FTIR אישר את ההשערות לגבי ריכוז גבוה של חומצות קרבוקסיליות בחא"מ מהמקורות השונים, ונתן אישור נוסף לנתונים שהתקבלו מאנליזת H-NMR
4. <u>הבעיות שנותרו לפתרון ו/או השינויים שחלו במהלך העבודה (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים); התייחסות המשך המחקר לגביהן.</u>
הבנת איזותרמת הספיחה של החא"מ לנחושת בריכוזי נחושת נמוכים
5. <u>האם הוחל כבר בהפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח - יש לפרט: פרסומים - כמקובל בביבליוגרפיה, פטנטים - יש לציין מס' פטנט, הרצאות וימי עיון - יש לפרט מקום ותאריך.</u>
לא
<u>פרסום הדו"ח:</u> אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
• ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)

נספח 1: תכולת מתכות בחא"מ, לאחר סינון בפילטר מן 0.45

Ca mg/L	Mg mg/L	K mg/L	Fe µg/L	Zn µg/L	Sr µg/L	Ni µg/L	Mo µg/L	Li µg/L	Co µg/L	Ba µg/L	B mg/L	שם הדוגמא*
71.0	27.5	34.6	120.9	187.7	656.6	23.7	<IDL	5.6	<IDL	41.5	0.2	EW-1
74.8	26.7	22.0	120.8	60.4	547.2	15.0	5.1	6.5	<IDL	45.2	0.2	EW-2
83.4	27.6	20.6	83.8	69.1	613.2	15.7	5.5	5.1	<IDL	42.8	0.2	EW-3
59.8	26.5	27.4	26.1	46.5	564.5	11.5	<IDL	9.6	<IDL	35.5	0.1	EW-4
682.5	492.6	282.6	201.1	485.3	4918.2	424.5	62.5	26.6	26.7	372.1	1.1	TL-1
495.8	294.9	183.0	61.7	228.2	3601.2	277.9	34.2	18.7	12.8	249.7	0.7	TL-2
182.5	479.8	140.7	101.8	106.7	5488.4	340.5	56.2	20.3	10.3	471.4	0.7	TL-3
329.5	494.9	301.7	32.4	134.0	3421.8	499.2	37.7	87.2	15.9	220.0	1.6	TL-4
490.9	251.9	84.8	456.2	107.0	3988.5	211.1	6.8	32.7	5.1	537.9	0.7	EL-1
227.2	887.7	509.5	147.9	229.4	5010.6	773.8	56.1	135.1	30.5	396.4	2.4	EL-2
364.8	477.2	273.2	68.3	294.8	3940.6	483.7	69.4	91.2	15.6	375.7	1.5	EL-3
437.1	386.8	320.1	80.2	461.7	4298.7	291.5	62.2	81.6	13.4	189.9	1.0	EL-4

[illegible]

Ca	Mg	K	Fe	Zn	Sr	Ni	Mo	Mn	Cu	Cr	Co	Ba	סוג הדוגמא	שם הדוגמא*
62.5	25.0	18.7	1480.0	210.0	<IDL	59.0	5.8	70.0	31.0	33.0	<IDL	80.0	תרכיז	EW-2
62.5	25.3	22.1	77.2	99.4	527.3	11.1	4.1	31.3	7.9	<IDL	<IDL	59.9	תסנין	
58.9	23.5	15.9	560.0	310.0	<IDL	49.0	16.0	48.0	37.0	59.0	<IDL	45.0	תרכיז	EW-3
58.9	26.9	20.1	84.6	128.2	595.8	9.7	4.6	22.8	5.0	6.7	<IDL	45.0	תסנין	
57.6	23.8	24.5	130.0	51.0	520.0	39.0	5.3	16.0	16.7	7.2	<IDL	<IDL	תרכיז	EW-4
57.6	27.1	28.4	42.0	50.0	570.0	15.0	<IDL	15.0	6.0	<IDL	<IDL	37.0	תסנין	
55.8	41.9	53.4	331.3	205.3	535.2	175.3	780.0	23.1	38.6	10.5	20.7	36.6	תרכיז	TL-1
592.9	573.0	698.3	346.2	707.5	5199.6	436.9	18.4	45.5	25.0	7.5	30.8	301.1	תסנין	
115.7	50.3	46.1	796.0	296.0	784.6	204.9	74.7	140.6	111.1	9.4	38.9	12.5	תרכיז	TL-2
529.7	336.3	525.8	269.8	277.0	3679.1	261.8	15.7	249.1	22.3	9.7	16.9	140.0	תסנין	
96.9	44.1	29.1	506.5	80.0	752.0	185.5	151.9	8.7	74.4	13.7	24.2	66.4	תרכיז	TL-3
687.6	413.8	372.2	471.4	128.1	4926.2	273.7	14.9	26.2	18.1	6.7	11.2	369.0	תסנין	
127.9	95.9	81.0	10940.3	602.8	1135.5	836.2	33.4	213.7	191.4	15.3	63.4	31.3	תרכיז	TL-4
286.5	437.2	675.0	235.1	212.6	3031.5	389.7	31.1	276.8	21.3	4.4	18.6	134.2	תסנין	
65.3	57.8	35.3	4319.8	118.1	901.6	435.6	8.1	569.2	25.8	34.3	39.3	107.0	תרכיז	EL-1
197.9	287.8	255.5	479.2	57.6	3125.3	189.7	<IDL	1251.9	10.5	9.8	9.4	286.5	תסנין	
20.6	59.9	60.3	1971.9	177.6	604.4	363.5	44.9	28.4	105.0	9.8	36.1	47.0	תרכיז	EL-2
105.2	746.9	697.2	430.4	242.1	4269.4	618.7	30.3	117.8	37.5	5.4	31.8	275.2	תסנין	
53.8	66.7	81.2	439.2	373.8	921.4	274.9	43.4	13.9	116.5	15.6	38.5	34.3	תרכיז	EL-3
209.7	379.2	604.9	182.6	385.3	3882.8	253.3	45.2	30.9	17.9	8.1	17.8	123.3	תסנין	
54.9	19.1	20.9	899.2	257.3	525.8	76.4	5.5	47.4	29.7	27.3	4.2	52.0	תרכיז	EL-4
71.8	26.8	35.0	837.3	235.3	706.6	21.1	<IDL	65.9	5.7	5.1	<IDL	54.9	תסנין	

200 Da > n"אן 1.2
 200 Da < n"אן 1 kDa - תוצות

SV	OD	pH	EC	DOC	גורם	שם
254 nm	254 nm		ms/cm	mg/L	תוצות	תוצות
1.35	0.34	6.2	1.1	25.2	תוצות	EW-2
6.00	0.03	6.4	0.8	0.5	תוצות	
1.55	0.21	4.9	0.9	13.5	תוצות	EW-4
1.58	0.03	3.8	0.5	1.9	תוצות	
1.99	1.59	6.2	2.1	79.8	תוצות	TL-1
9.33	0.14	6.3	2.2	1.5	תוצות	
0.92	1.19	5.6	1.2	129.0	תוצות	TL-2
1.67	0.02	6.4	0.4	1.2	תוצות	
2.94	1.81	6.0	1.6	61.5	תוצות	TL-3
3.08	0.08	6.2	2.8	2.6	תוצות	
3.10	1.08	6.6	0.9	34.8	תוצות	TL-4
2.37	0.09	6.7	2.7	3.8	תוצות	
2.64	1.47	7.0	1.9	55.7	תוצות	EL-1
3.33	0.03	7.0	1.4	0.9	תוצות	
2.19	0.60	5.3	0.9	27.4	תוצות	EL-3
3.33	0.10	5.4	2.7	3.0	תוצות	

Ca mg/L	Mg mg/L	K mg/L	Fe µg/L	Zn µg/L	Sr µg/L	Ni µg/L	Mo µg/L	Mn µg/L	Cu µg/L	Cr µg/L	Co µg/L	Ba µg/L	סוג הדוגמא	שם הדוגמא*
72.9	32.4	6.13	40.0	160.0	615.0	16.0	6.4	36.0	<IDL	<IDL	<IDL	54.8	תרכיז	EW-2
20.4	6.9	11.5	3.9	21.0	177.0	<IDL	<IDL	8.5	<IDL	<IDL	<IDL	18.0	תסנין	
67.4	31.0	3.08	71.0	150.0	680.0	30.0	<IDL	22.0	13.0	7.0	5.4	<IDL	תרכיז	EW-4
10.7	4.0	3.6	8.3	33.0	100.0	8.0	<IDL	4.5	4.5	4.5	5.4	8.0	תסנין	
<IDL	214.3	<IDL	1535.0	260.0	<IDL	340.0	14.0	53.0	<IDL	9.1	8.9	91.0	תרכיז	TL-1
28.5	28.2	33.5	27.5	25.0	230.0	12.7	4.0	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	11.0	תסנין	
<IDL	371.5	<IDL	1200.0	386.0	<IDL	560.0	52.6	265.0	12.0	15.7	25.7	110.0	תרכיז	TL-2
11.8	8.3	55.1	26.5	26.0	80.0	<IDL	<IDL	6.1	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	תסנין	
158.0	140.8	1.5	39.0	123.0	1150.0	230.0	14.0	7.8	6.1	<IDL	6.5	79.0	תרכיז	TL-3
44.6	20.0	13.6	<IDL	28.0	360.0	10.0	<IDL	<IDL	18.0	<IDL	<IDL	26.0	תסנין	
37.0	59.2	7.9	105.0	190.0	390.0	120.0	10.0	41.0	3.6	<IDL	4.0	17.0	תרכיז	TL-4
17.5	27.0	53.6	<IDL	17.0	186.0	17.5	<IDL	17.0	<IDL	<IDL	<IDL	6.8	תסנין	
41.4	103.4	<IDL	746.0	132.0	<IDL	230.0	12.0	416.0	13.2	13.8	5.9	67.0	תרכיז	EL-1
13.2	17.7	9.6	105.0	20.0	170.0	<IDL	<IDL	77.0	<IDL	4.8	<IDL	19.0	תסנין	
16.3	53.4	5.7	27.0	180.0	330.0	121.0	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	4.9	19.0	תרכיז	EL-3
10.4	28.6	6.2	9.3	74.6	210.0	25.0	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	<IDL	12.0	תסנין	

[illegible]

OD	254 nm	pH	EC	DOC	Ammonia Nit	Ammonia Phos
0.085	6.7	24.7	4.3			
0.069	6.4	18.2	3.5			1 pton
0.018	6.8	7.8	1.0			3 pton
0.019	4.1	3.3	2.0			4 pton
0.009	4.8	1.1	1.5			5 pton
0.011	5.3	23.8	2.7			1 pton
0.003	5.7	18.2	1.7			2 pton
0.007	6.7	8.7	7.2			3 pton
0.000	4.0	3.2	1.3			4 pton
0.003	5.1	0.7	0.5			5 pton
0.050	6.0	24.1	3.0			1 pton
0.039	6.2	19.0	2.8			2.1 pton
0.046	6.3	16.2	4.2			2.2 pton
0.027	7.1	6.5	6.4			3 pton
0.006	3.8	2.9	1.5			4 pton
0.006	3.9	1.6	0.8			5 pton
0.001	3.8	0.9	0.7			6 pton
0.002	4.1	0.6	0.7			7 pton
0.005	4.3	0.4	1.0			8 pton
0.006	4.5	0.3	0.6			9 pton
0.172	6.4	24.0	7.0			1 pton
0.091	6.6	16.6	3.9			2 pton
0.050	6.9	6.5	4.4			3 pton
0.015	3.8	2.6	0.4			4 pton
0.021	4.3	0.7	1.1			5 pton
0.094	7.1	22.5	3.3			1 pton
0.029	6.9	8.1	2.1			2 pton
0.033	7.2	3.6	2.9			3 pton
0.115	7.6	5.8	7.0			4 pton
0.087	7.2	1.6	4.5			5 pton
0.014	7.1	0.6	1.2			6 pton
0.022	7.0	0.3	1.9			7 pton
0.016	3.5	0.4	1.1			8 pton
0.034	3.7	0.3	1.4			9 pton
0.089	6.6	23.6	6.5			1 pton
0.037	6.4	19.3	2.7			2 pton
0.085	6.8	8.5	7.2			3 pton
0.030	4.0	3.6	2.6			4 pton
0.045	4.1	2.0	3.9			5 pton
0.045	4.6	0.5	2.3			6 pton

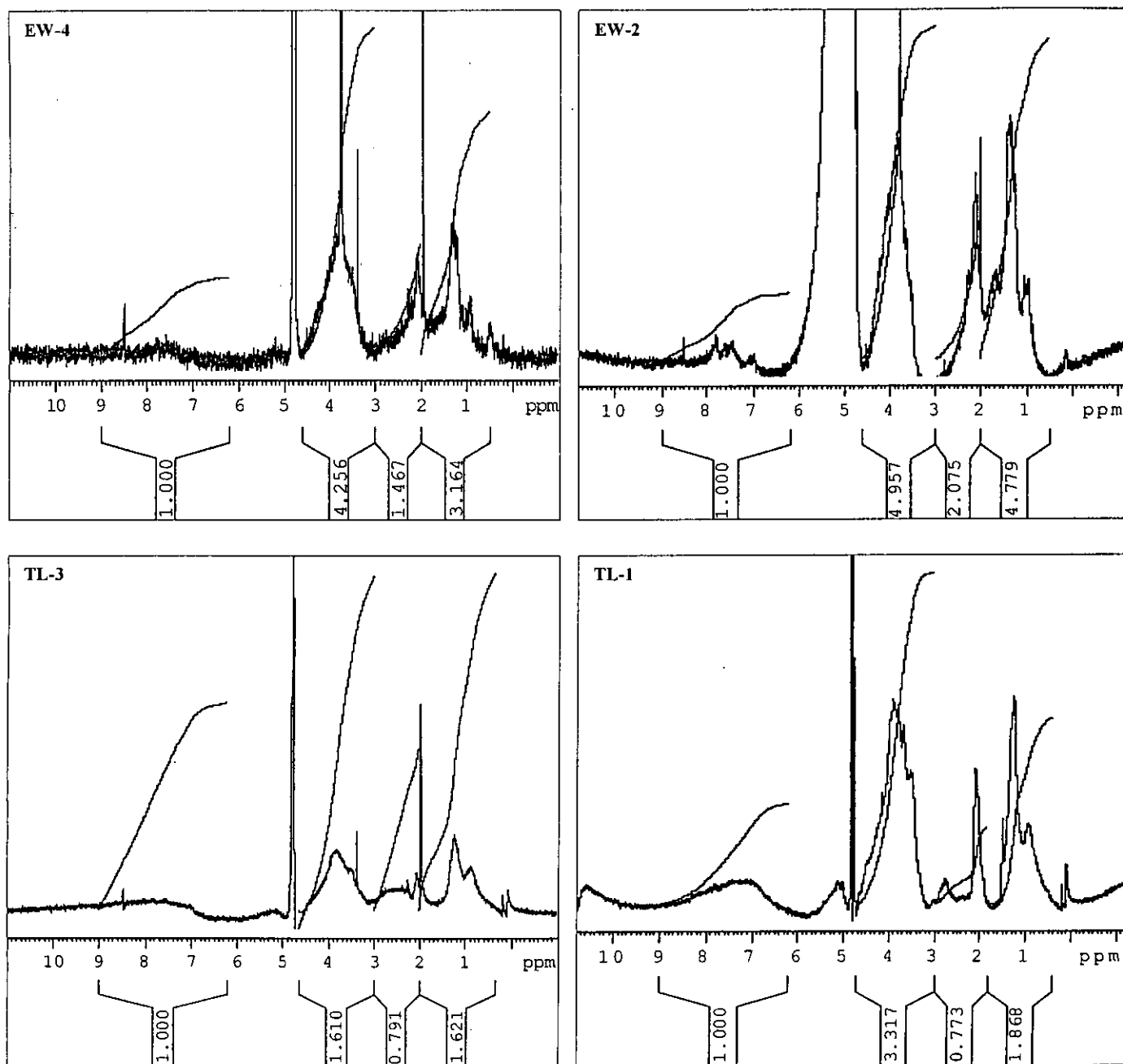
K mg/L	Zn µg/L	Sr µg/L	Ni µg/L	Mo µg/L	Mn µg/L	Cr µg/L	Co µg/L	Ba µg/L	סוג הדוגמא	שם הדוגמא*
18.7	210.0	<IDL	59.0	5.8	70.0	33.0	<IDL	80.0	BH	EW-2
1.4	77.7	108.3	36.6	<IDL	3.9	18.0	<IDL	10.2	AH	
38.5	204.6	533.5	17.5	77.7	23.1	10.5	20.6	36.5	BH	TL-1
<IDL	160.0	<IDL	147.0	98.0	32.0	9.4	12.6	10.0	AH	
25.0	95.2	894.9	22.1	18.1	10.4	16.4	20.6	79.0	BH	TL-3
0.9	154.3	205.2	160.4	46.9	<IDL	<IDL	18.6	24.2	AH	
26.8	123.8	944.7	456.4	8.5	596.4	35.9	41.2	112.1	BH	EL-1
1.2	65.2	187.4	331.5	16.0	229.1	22.0	30.9	44.4	AH	
59.6	378.4	932.9	278.2	43.9	14.1	15.8	38.9	34.7	BH	EL-3
1.3	150.3	172.4	219.6	182.6	<IDL	6.1	20.2	23.3	AH	

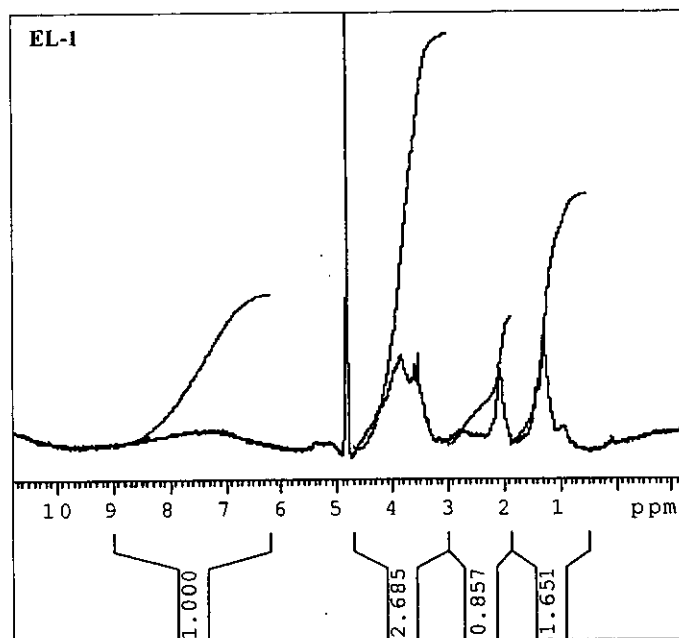
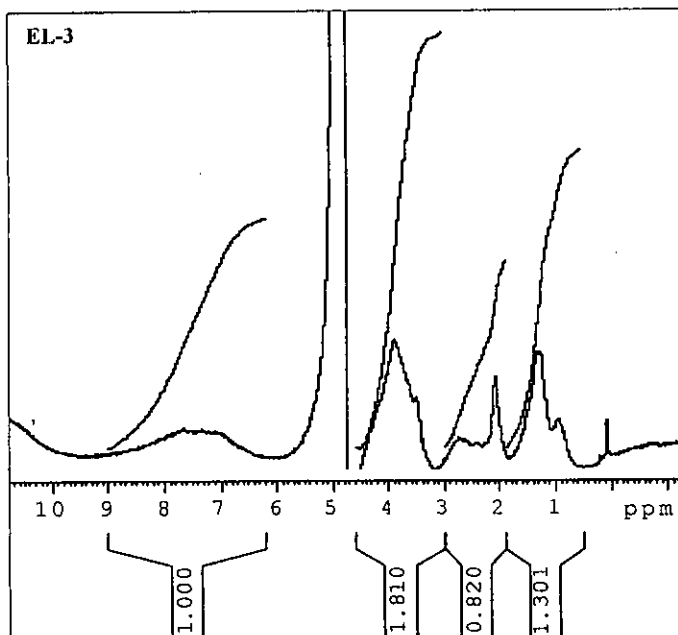
נספח 4: גרפים

איור 1: אנליזת ^1H -NMR

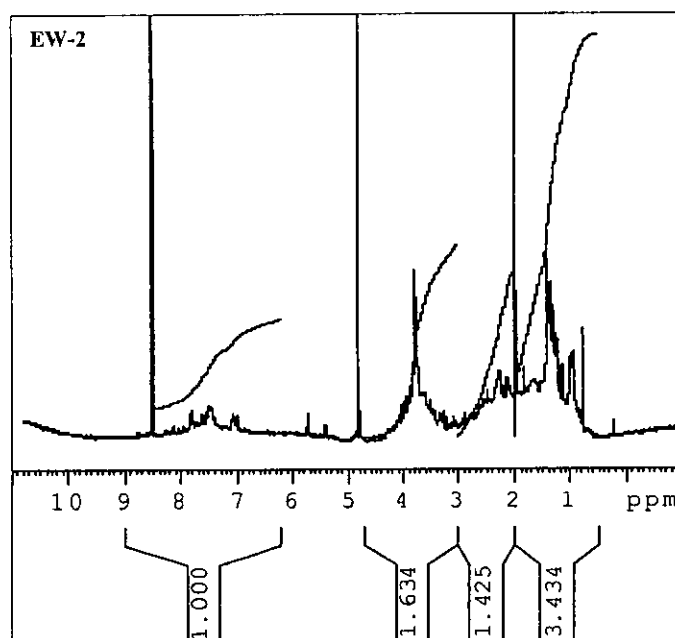
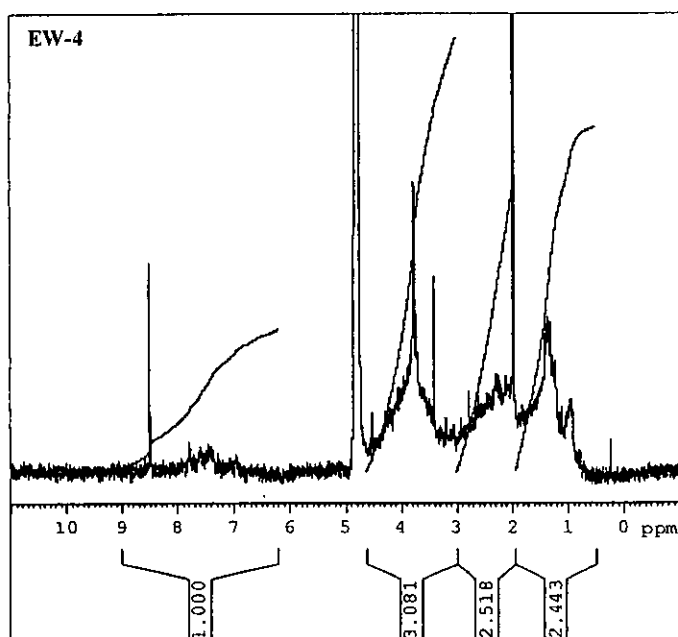
EW- מי קולחים; TL- נקז לאחר השקיה במים שפירים; EL- נקז לאחר השקיה במי קולחים

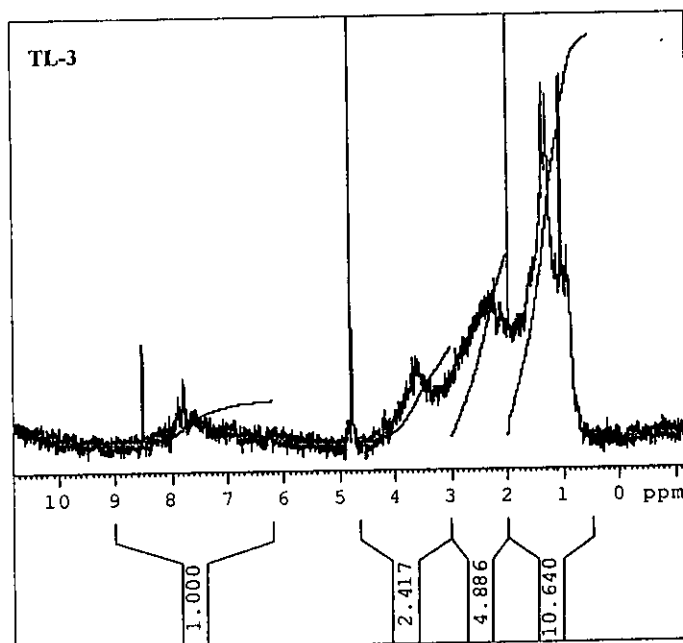
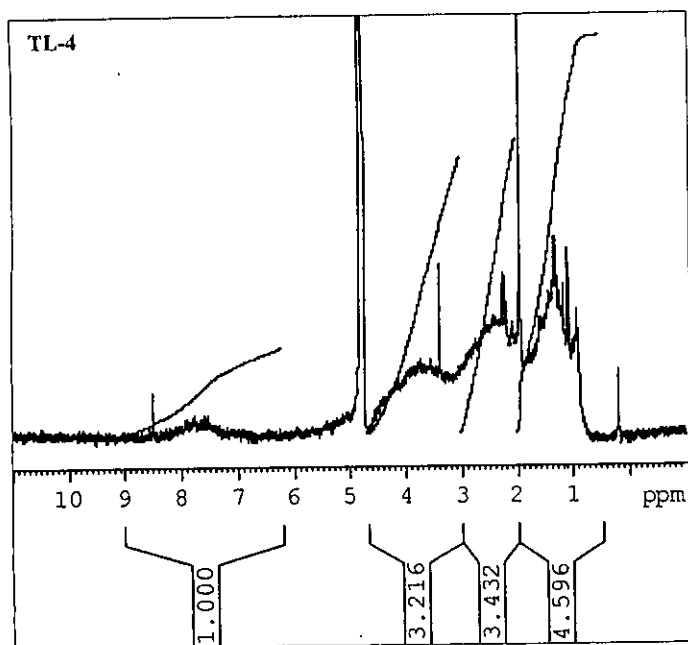
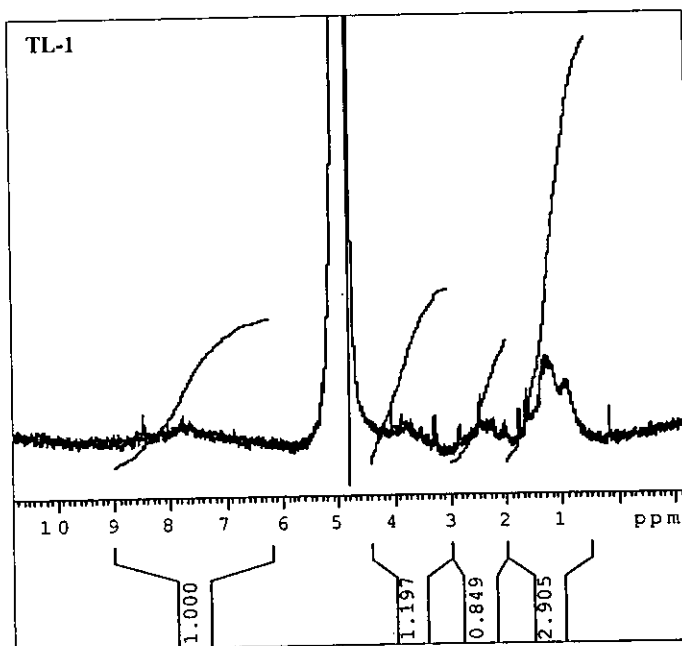
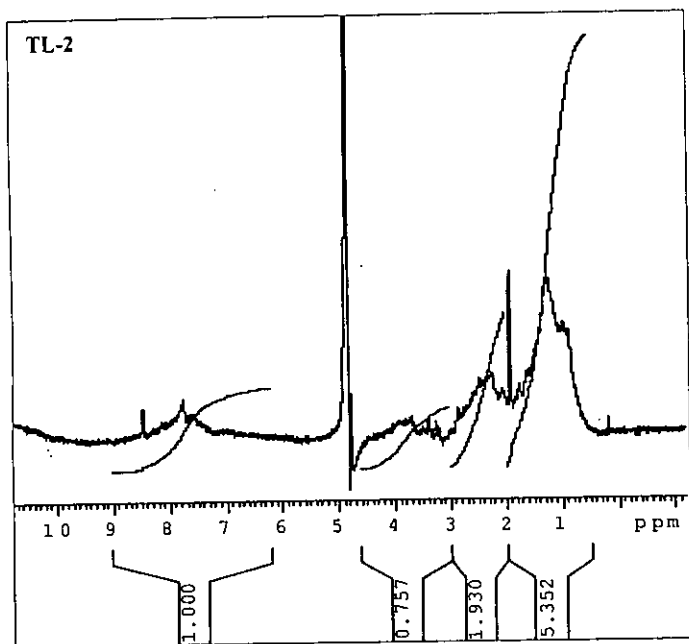
איור 1 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$

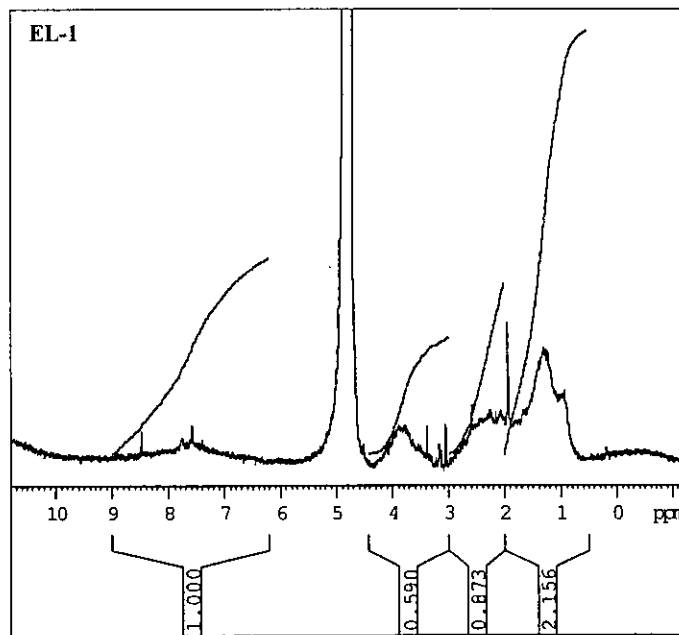
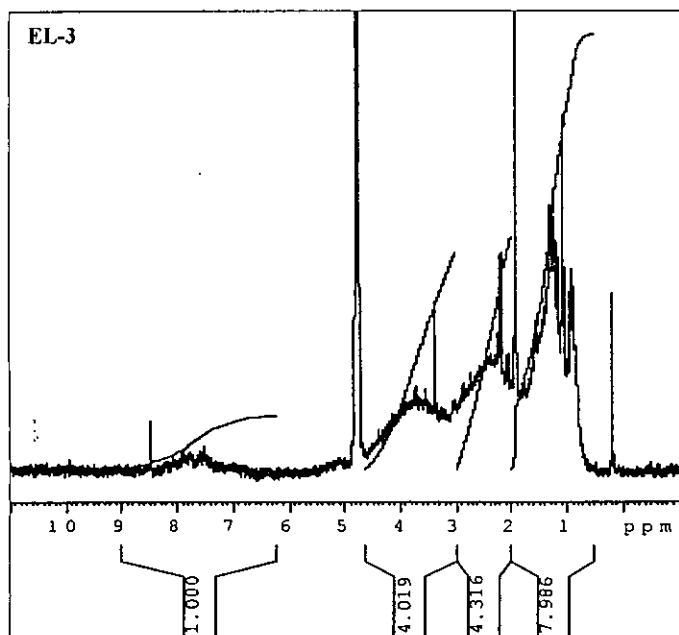




איור 1 ב': חא"מ במקטע הגודל 1 kDa < חא"מ < 200 Da



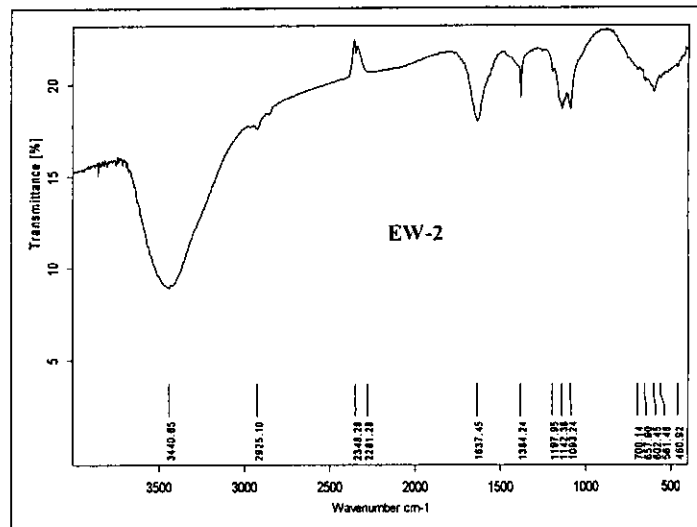
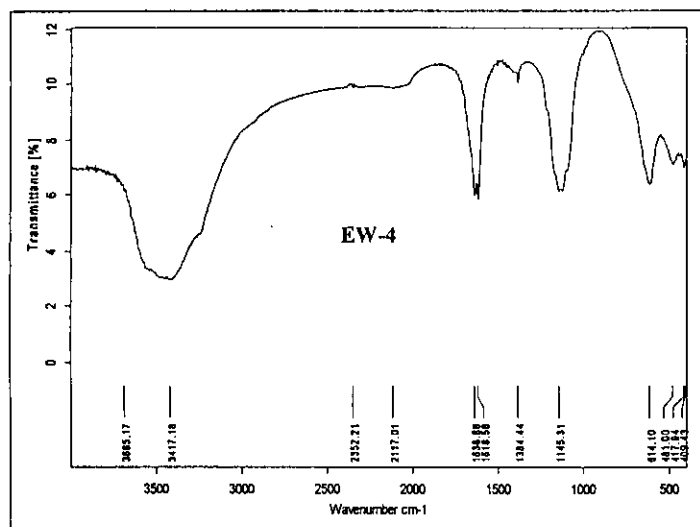


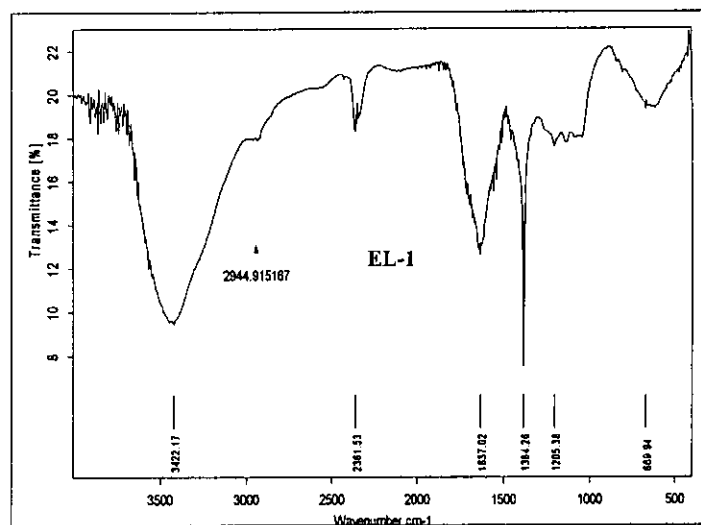
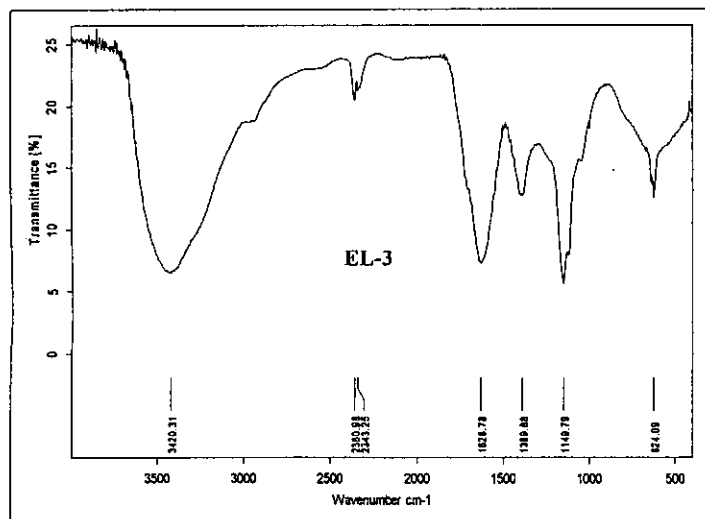
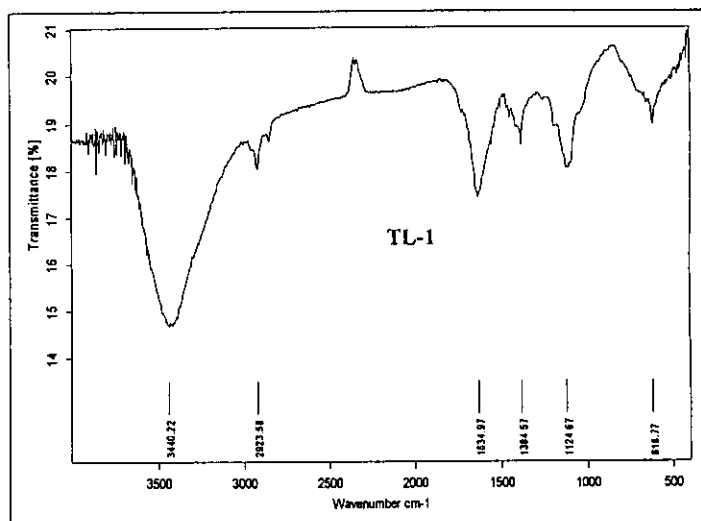
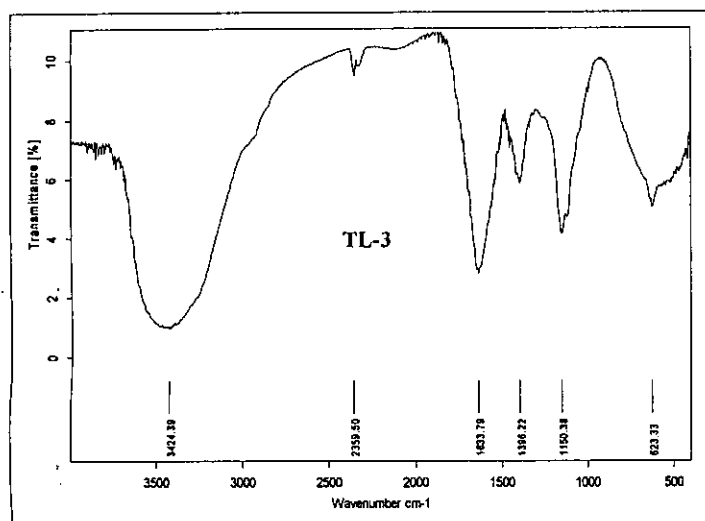


איור 2: אנליזת FTIR

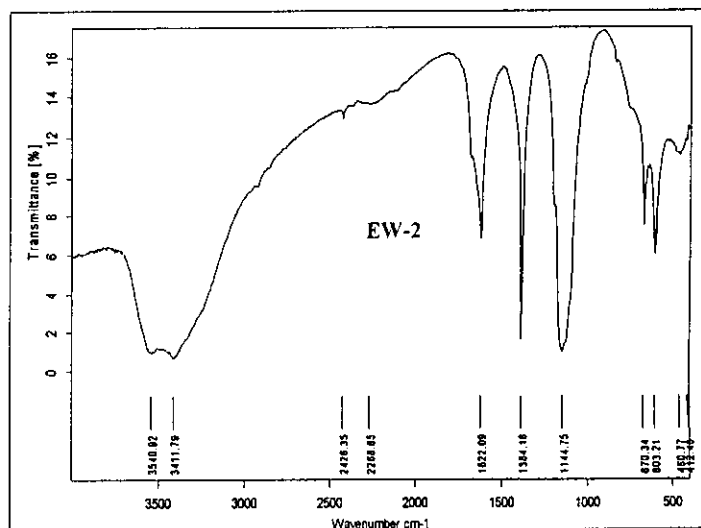
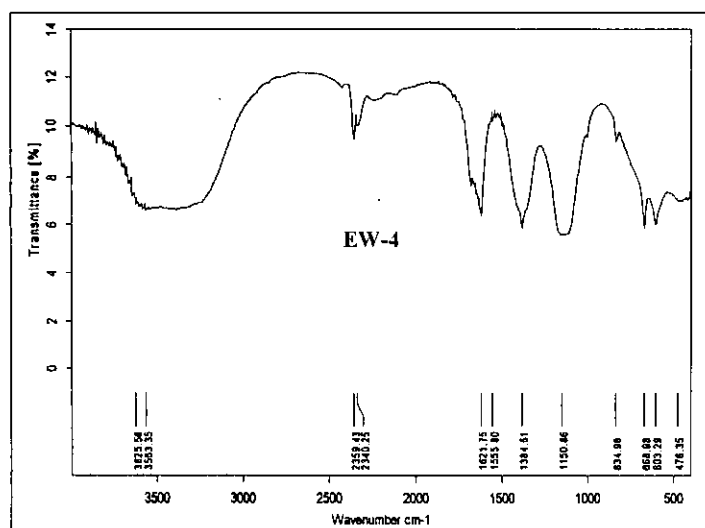
EW- מי קולחים; TL- נקז לאחר השקיה במים שפירים; EL- נקז לאחר השקיה במי קולחים

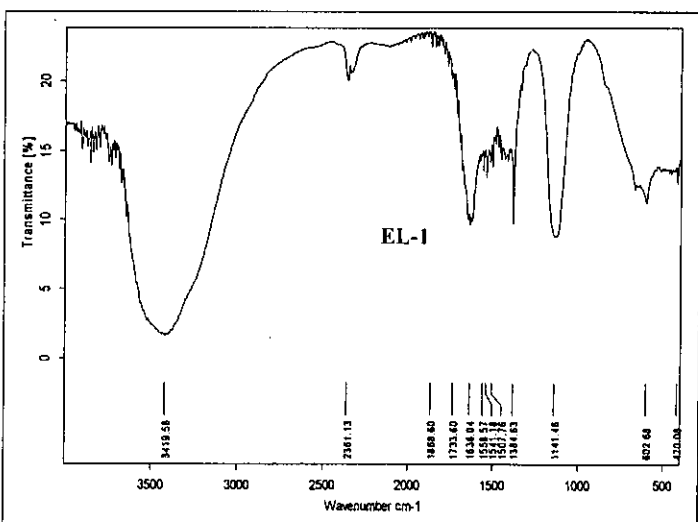
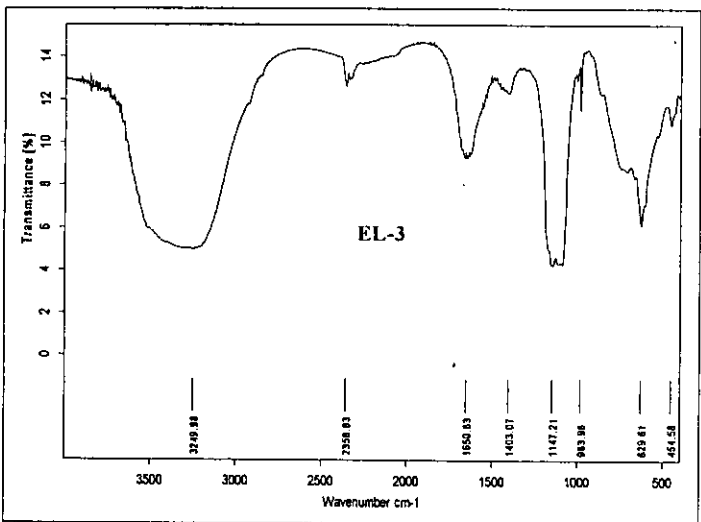
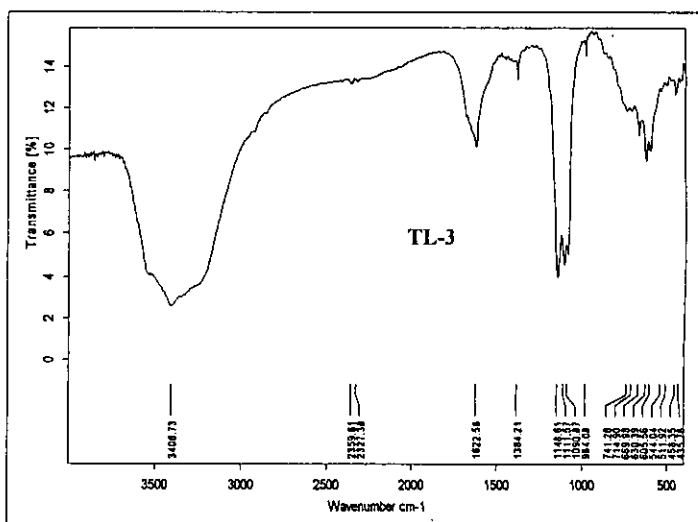
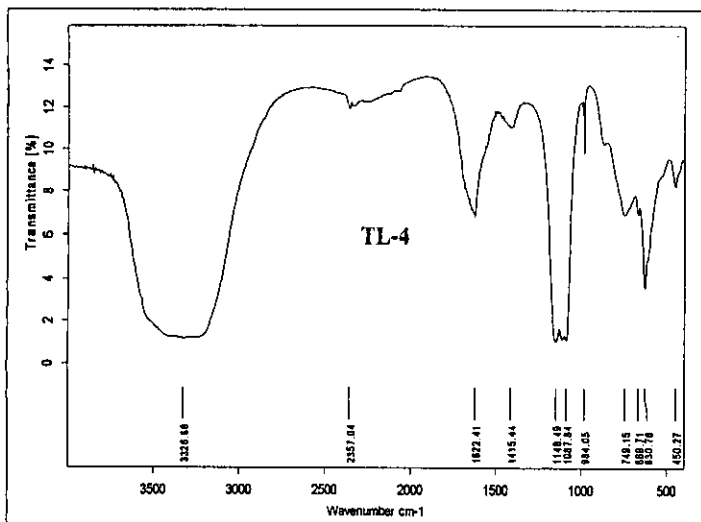
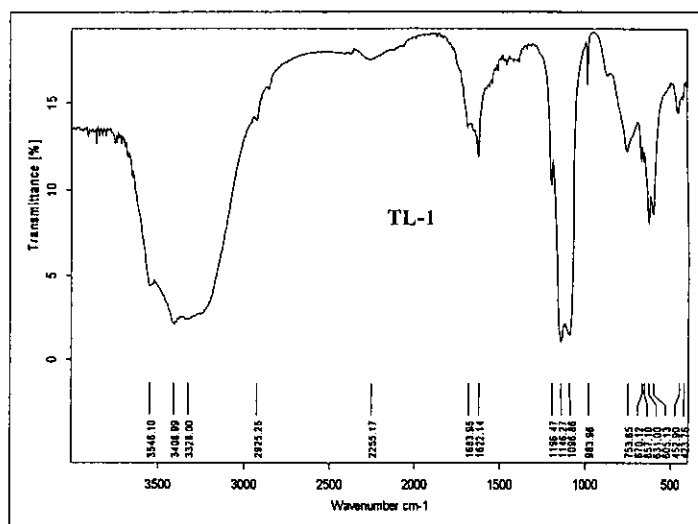
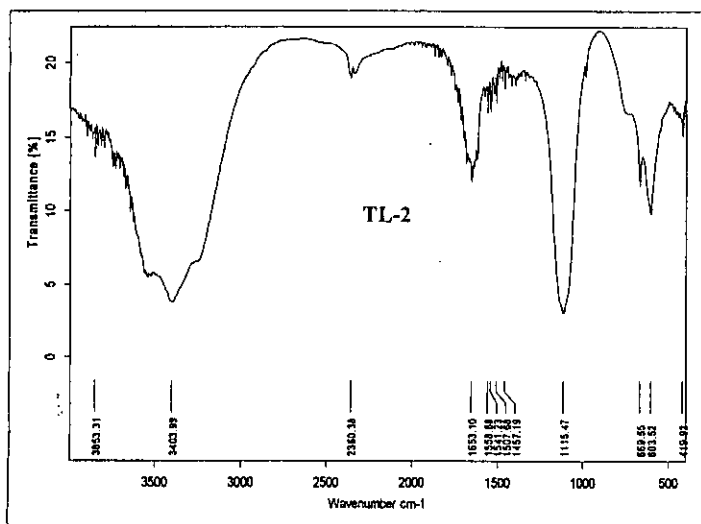
איור 2 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$



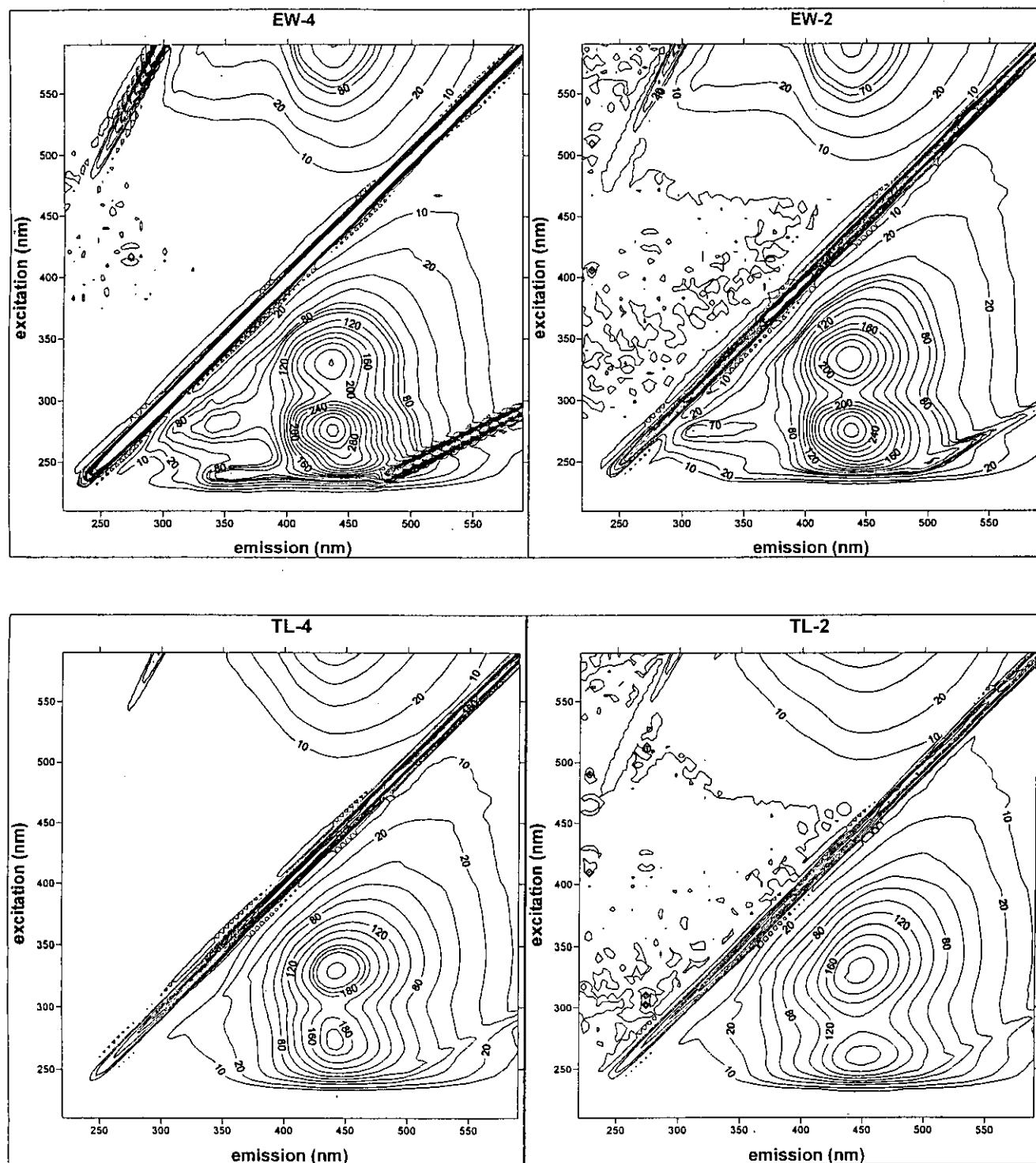


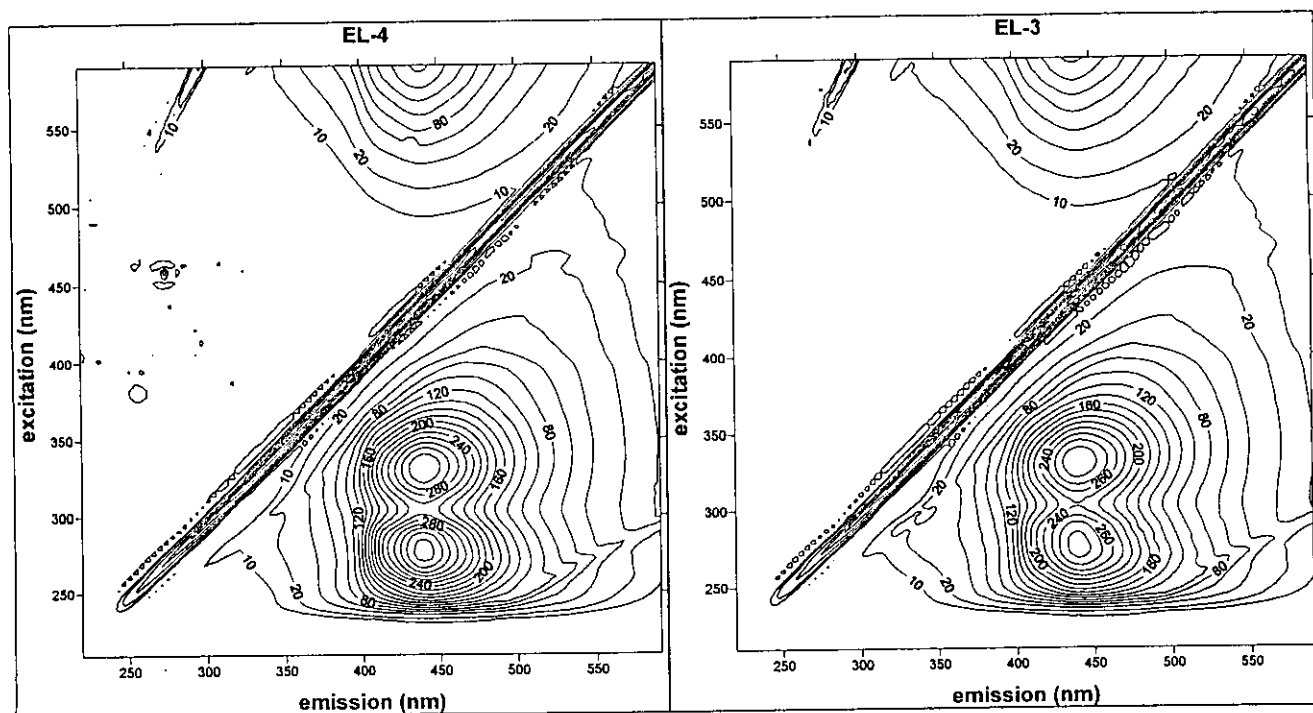
איור 2 ב': חא"מ במקטע הגודל 1 kDa < חא"מ < 200 Da



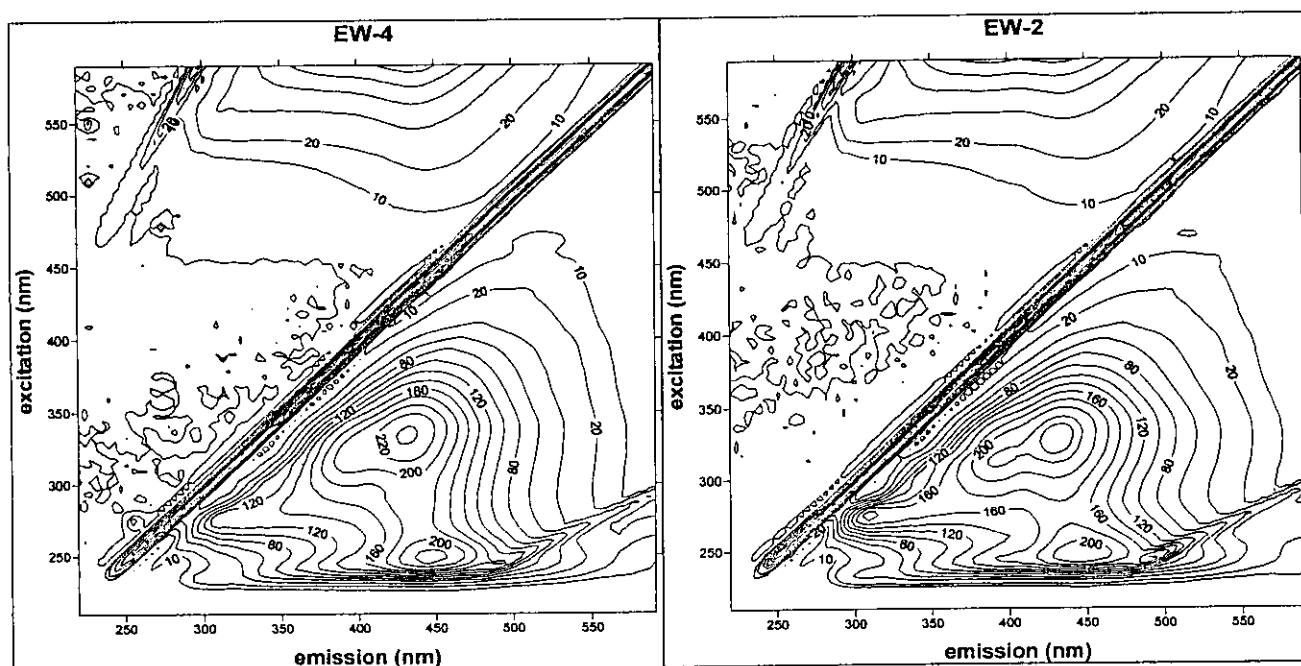


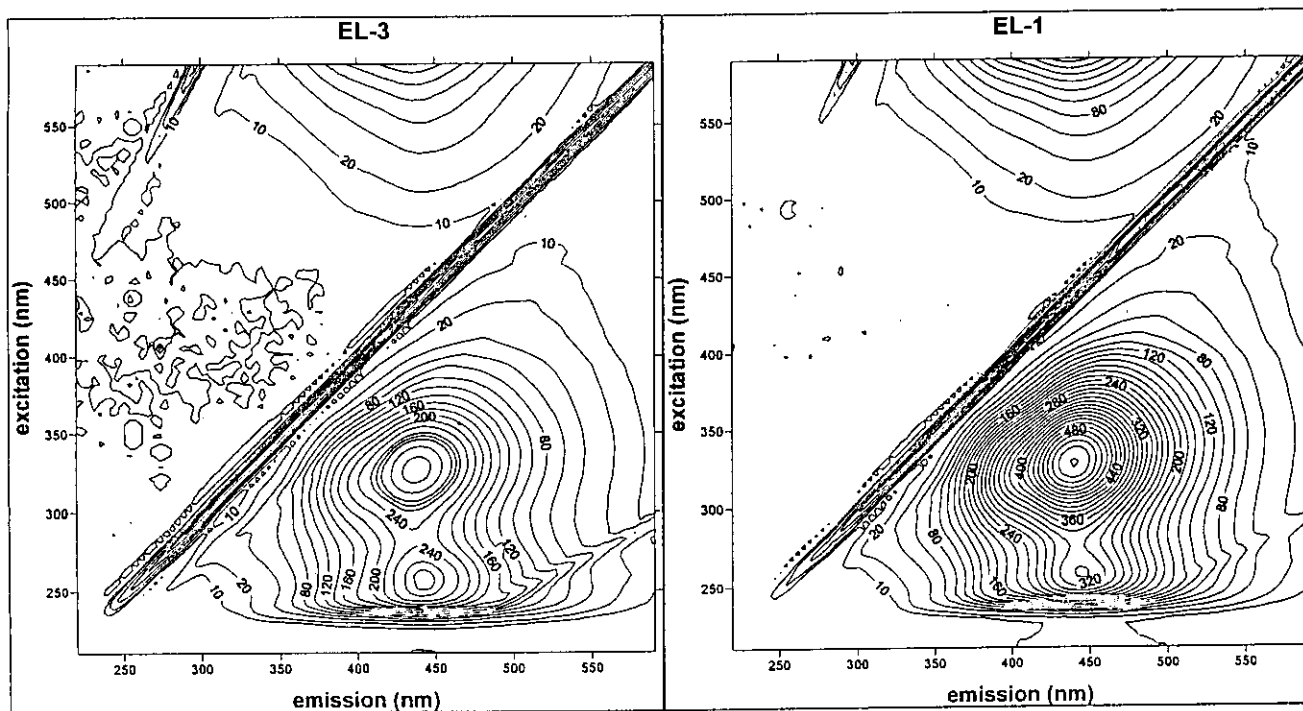
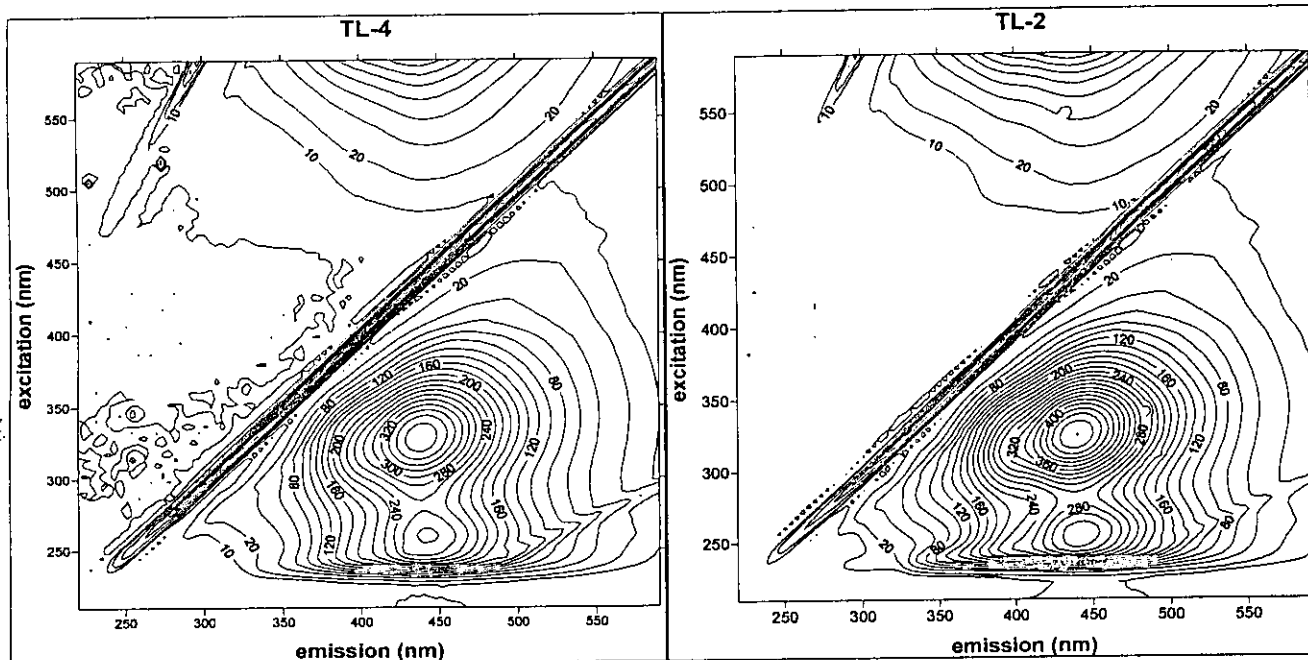
איור 3: מפות פלואורסצנטיות של דוגמאות החא"מ
 EW- מי קולחים; TL- נקז לאחר השקיה במים שפירים; EL- נקז לאחר השקיה במי קולחים
 איור 3 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$



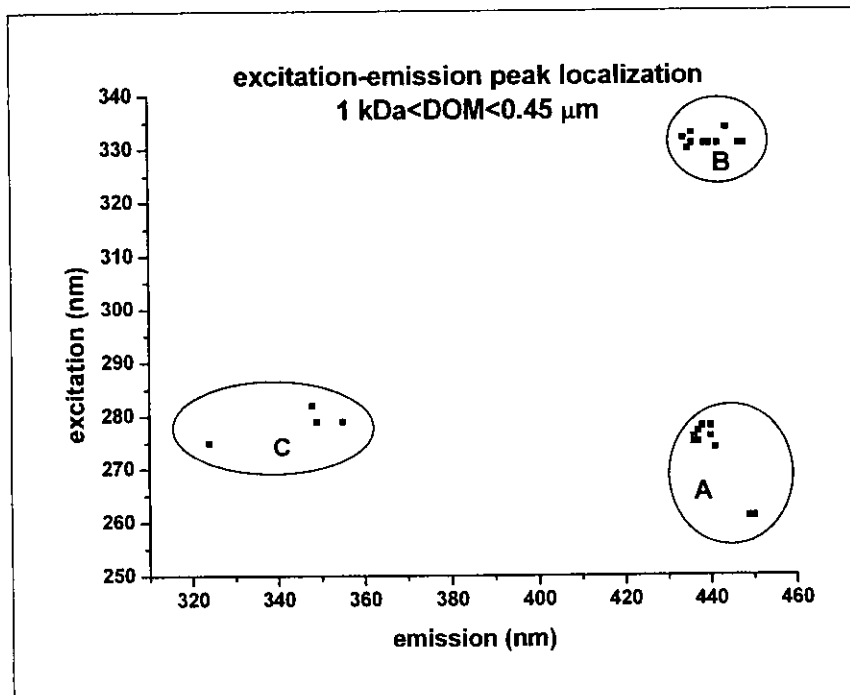


איור 3 ב': חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$



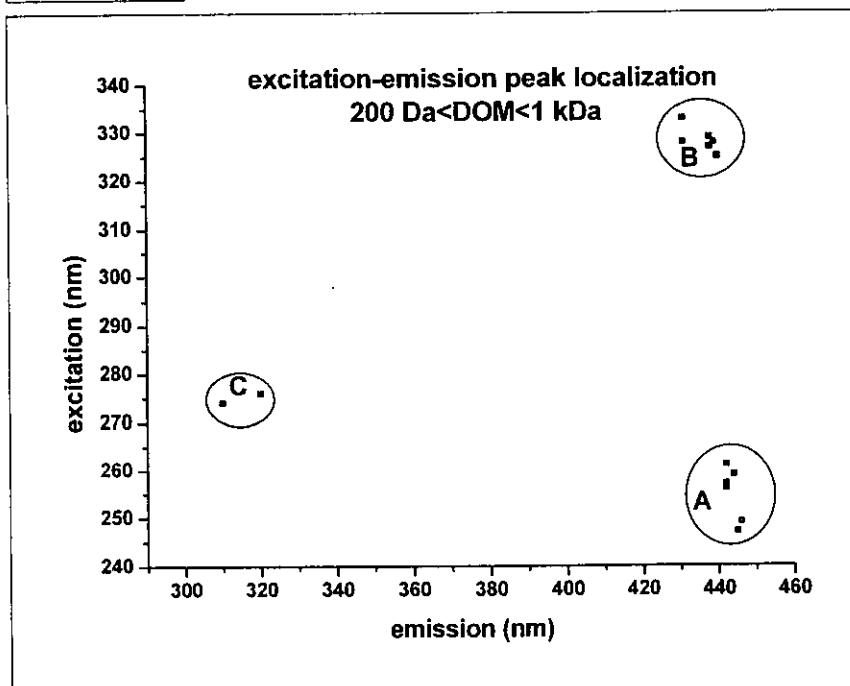


איור 4: מיקום הפיקים הפלואורסצנטיים בחא"מ (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה)
איור 4 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$

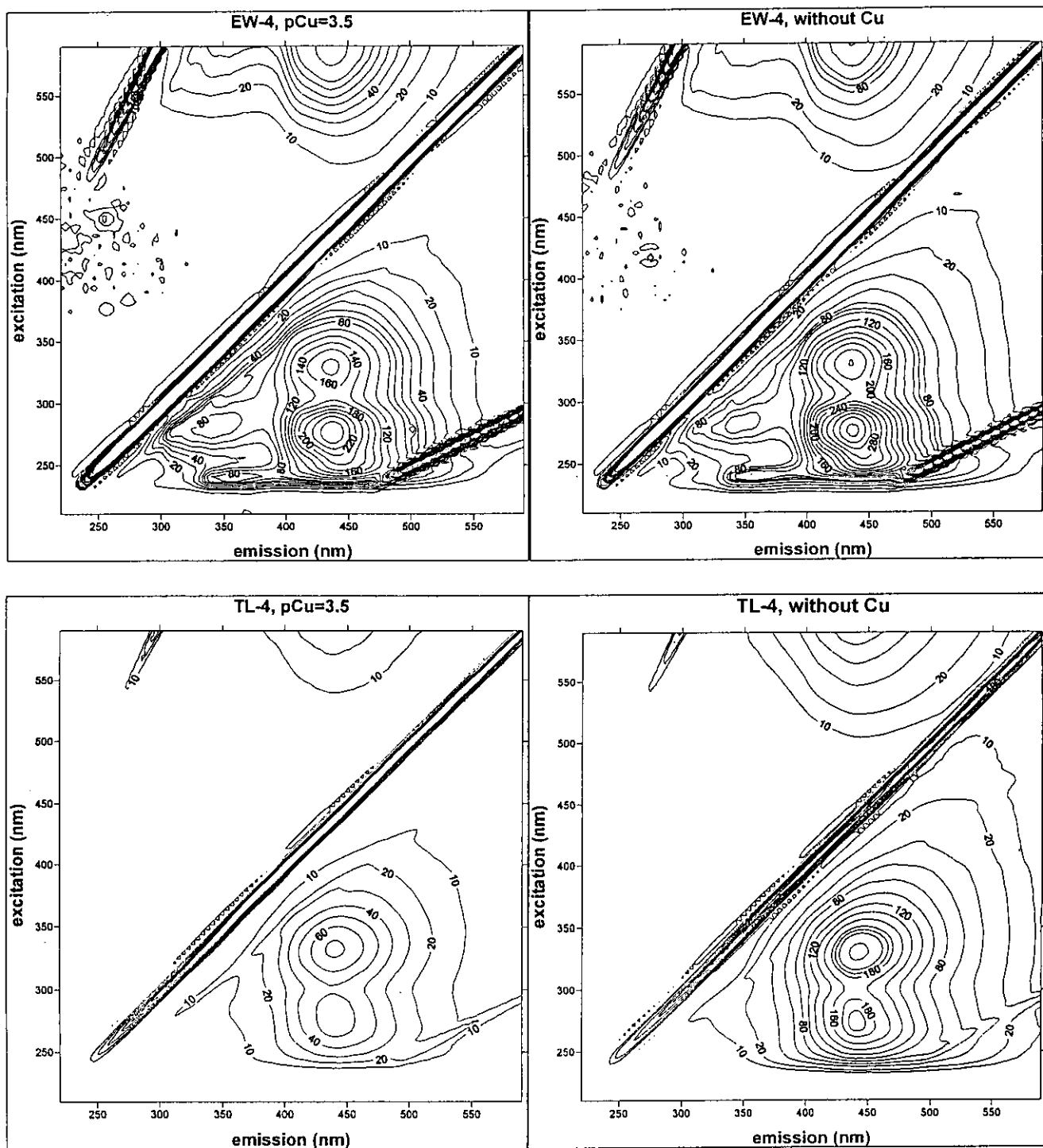


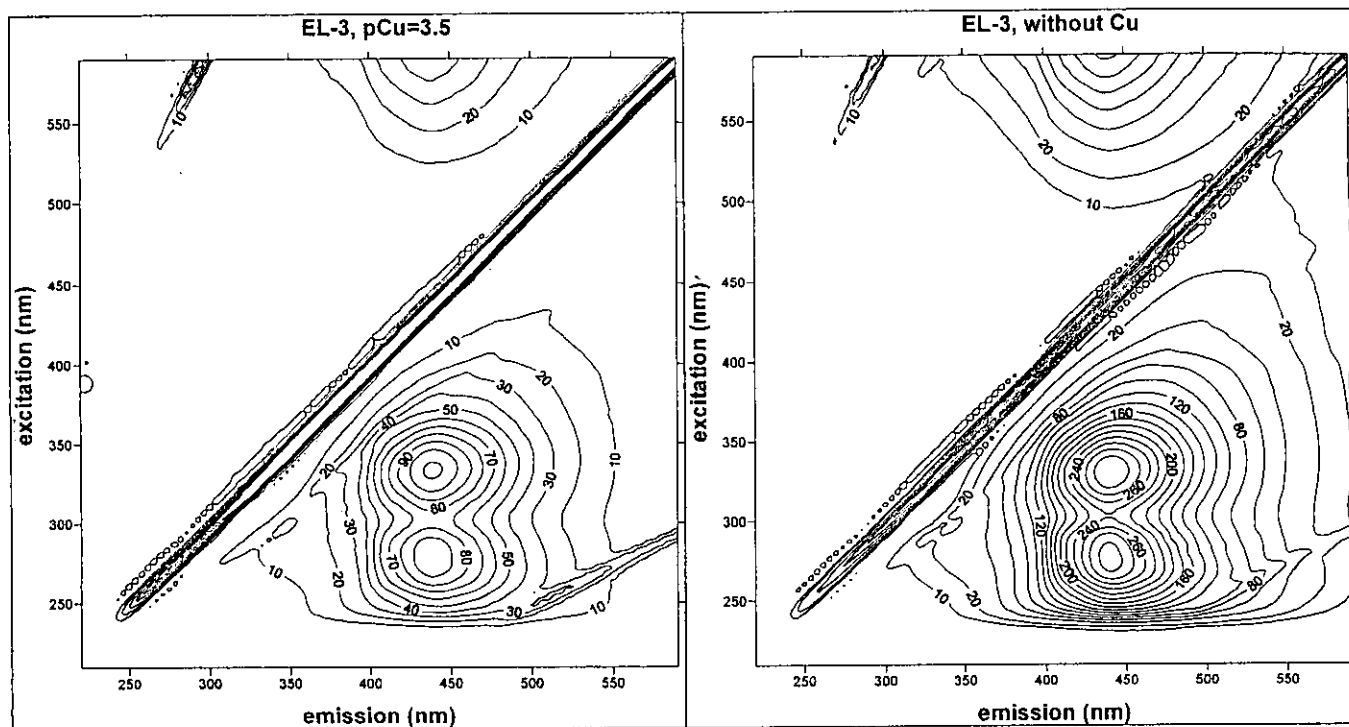
- נקז שפירים
- נקז קולחים
- מי קולחים

איור 4 ב': חא"מ במקטע גודל $200 \text{ Da} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$

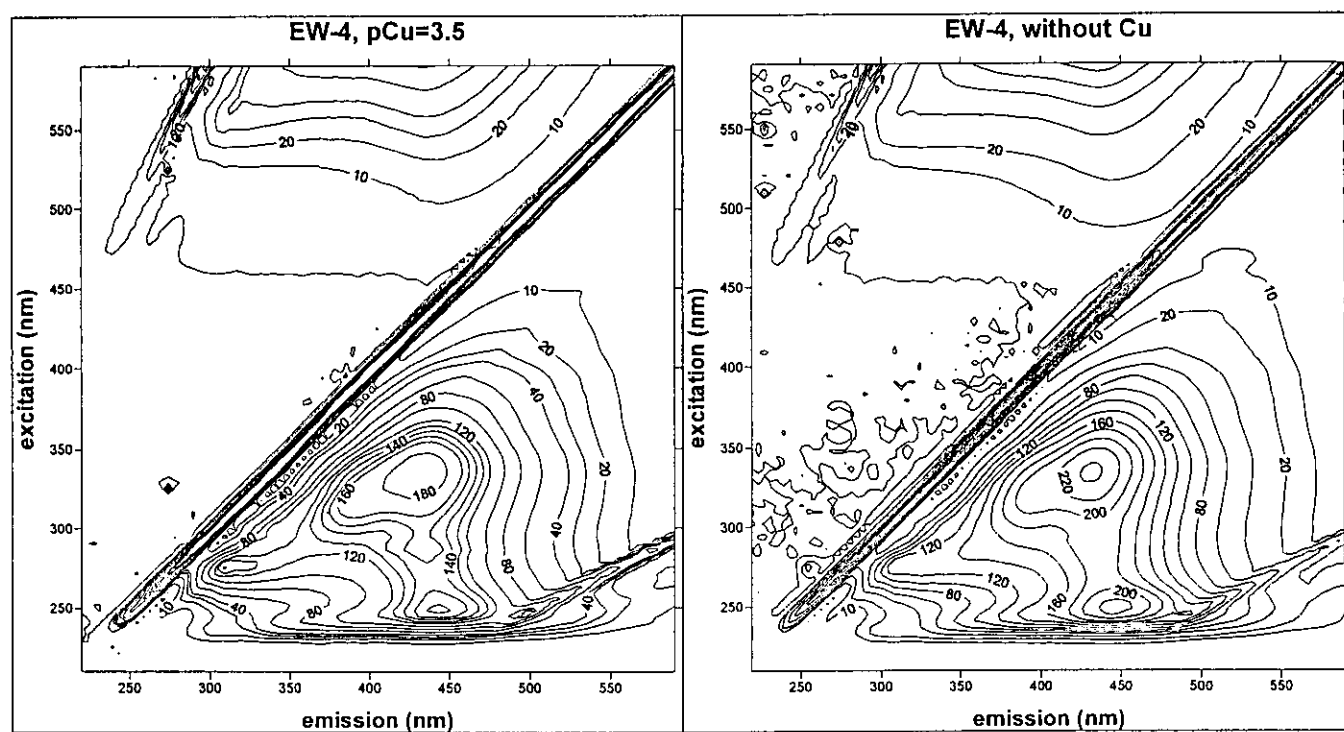


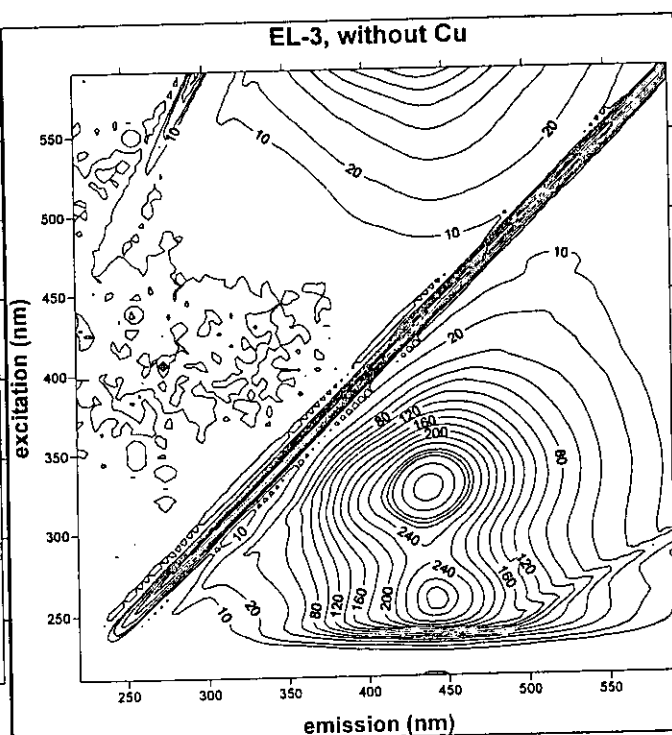
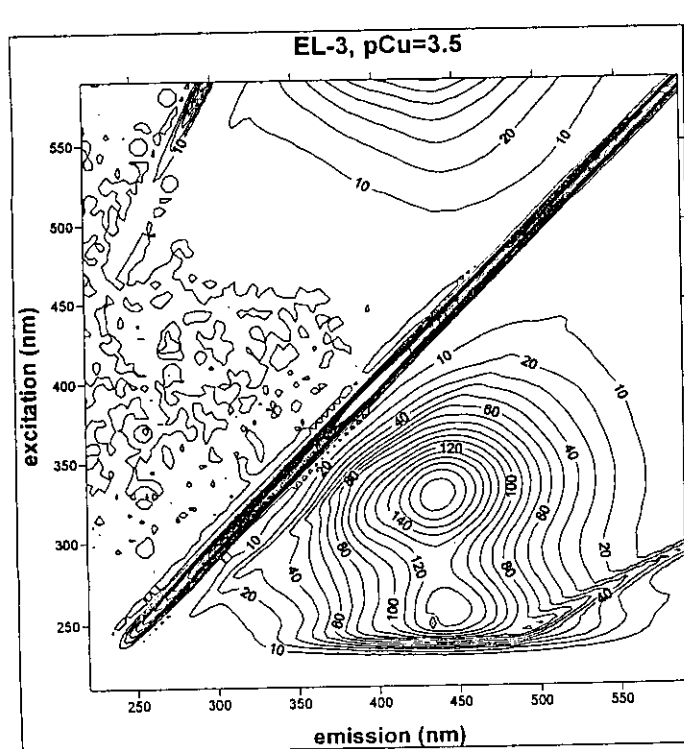
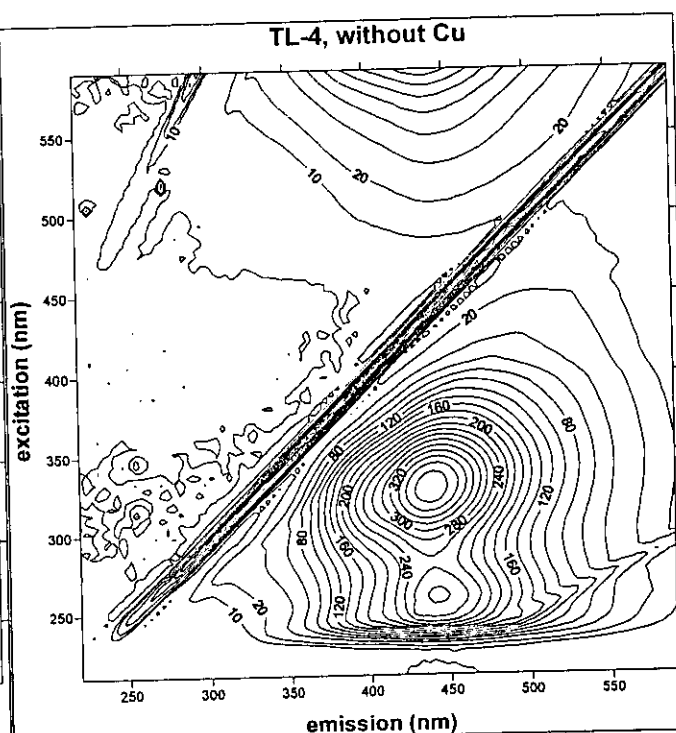
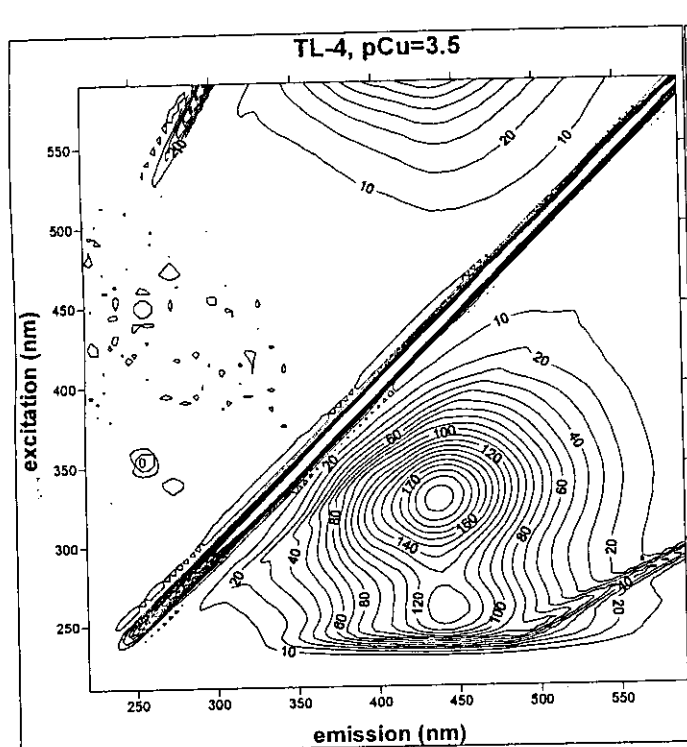
איור 5: השוואת המפות הפלואורסצנטיות, לפני ואחרי הוספת נחושת ($pCu=3.5$)
 EW- מי קולחים; TL- נקז לאחר השקיה במים שפירים; EL- נקז לאחר השקיה במי קולחים
 איור 5 א': מ"מ במקטע גודל $0.45 \mu m < \text{חא} < 1 \text{ kDa}$

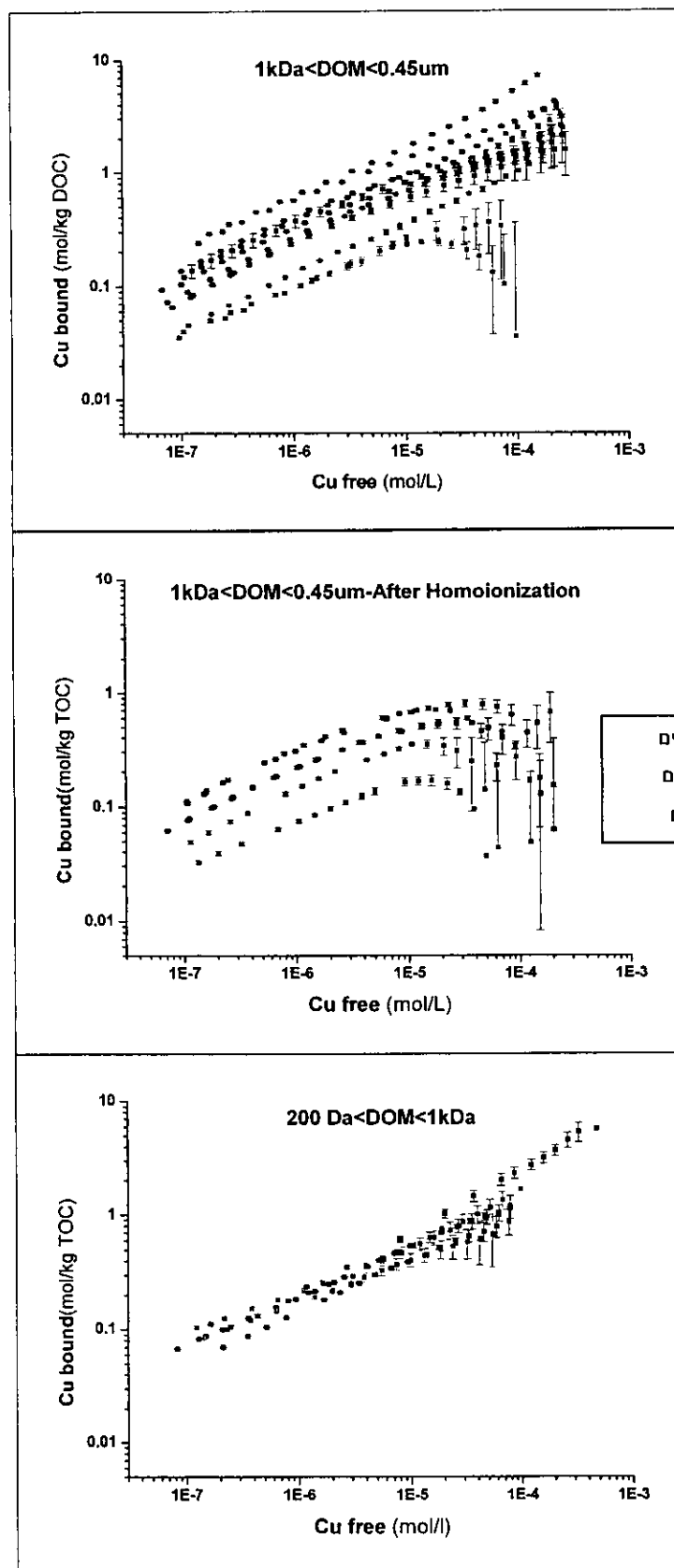




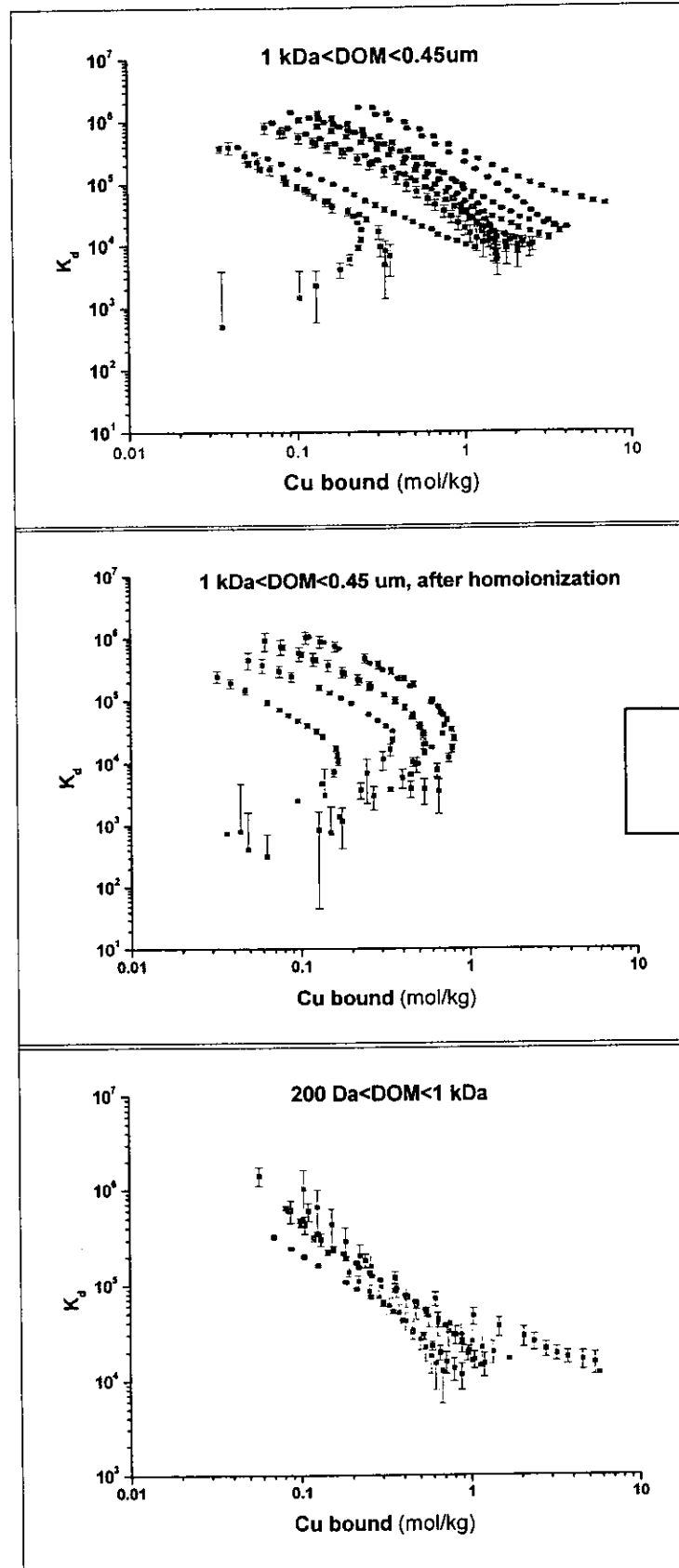
איור 5 ב': חא"מ במקטע הגודל $1 \text{ kDa} < \text{חא"מ} < 200 \text{ Da}$



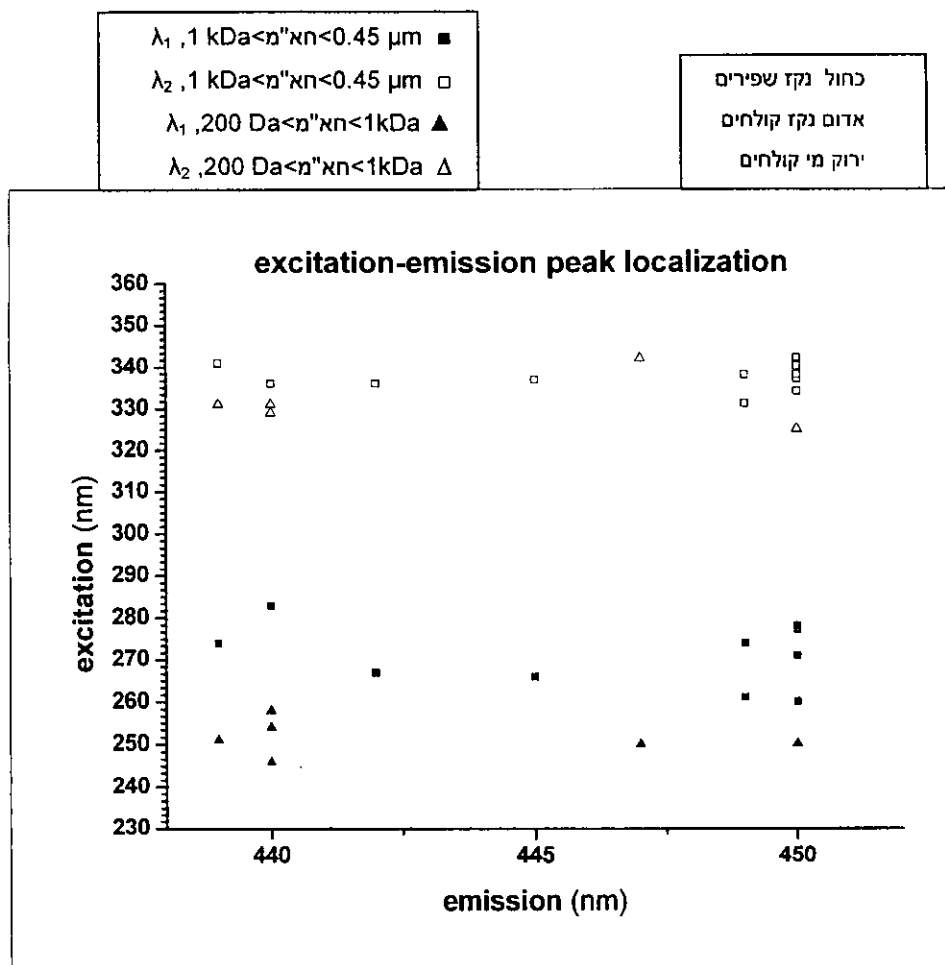




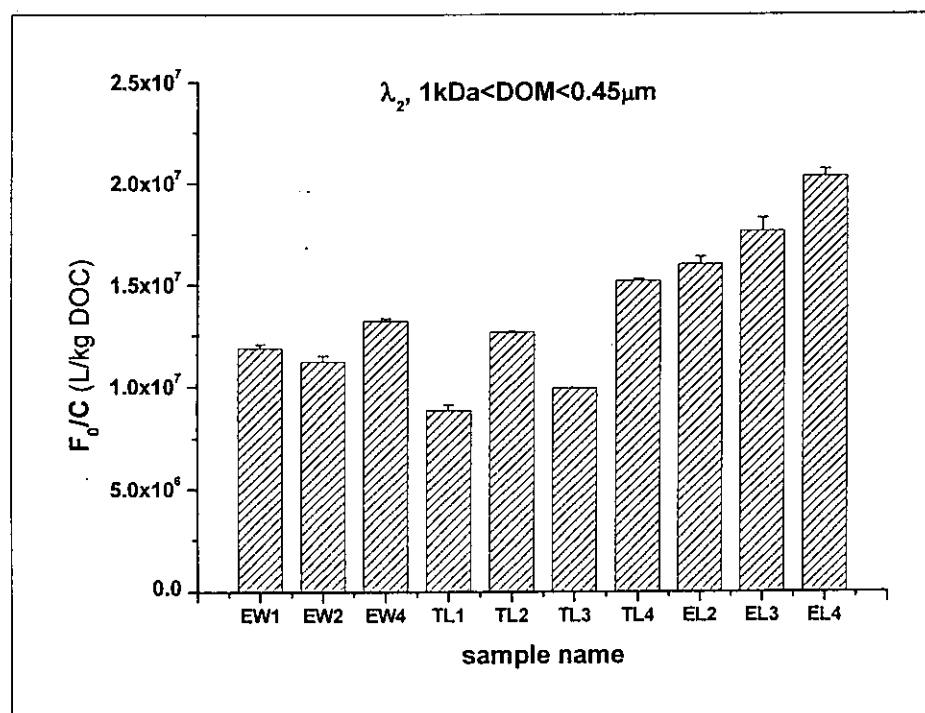
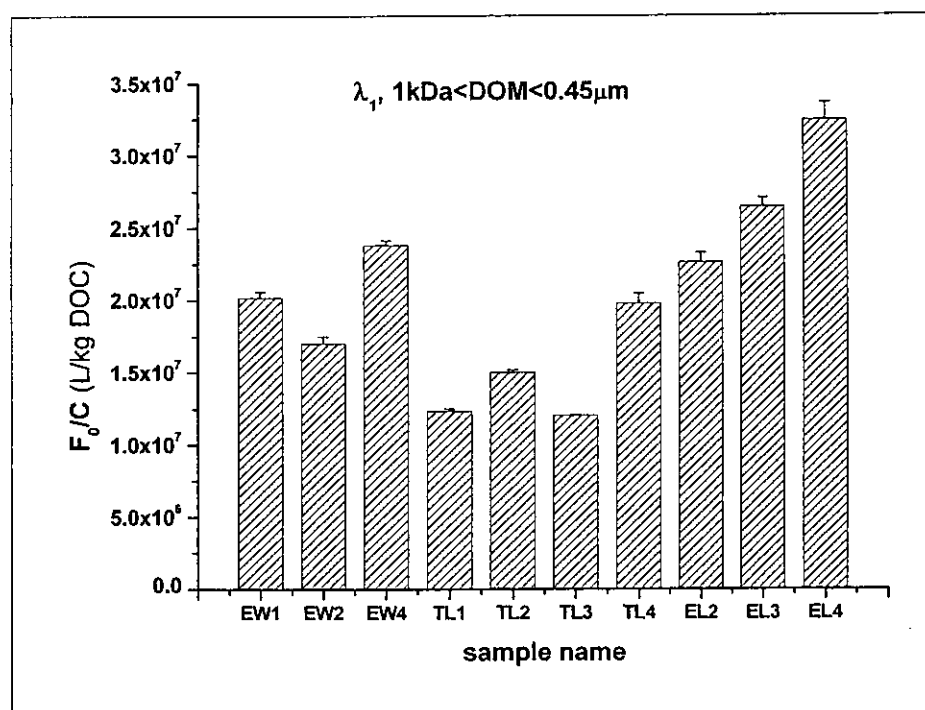
איור 7: מקדם החלוקה, K_d , כתלות בריכוז הנחושת הקשורה לחא"מ



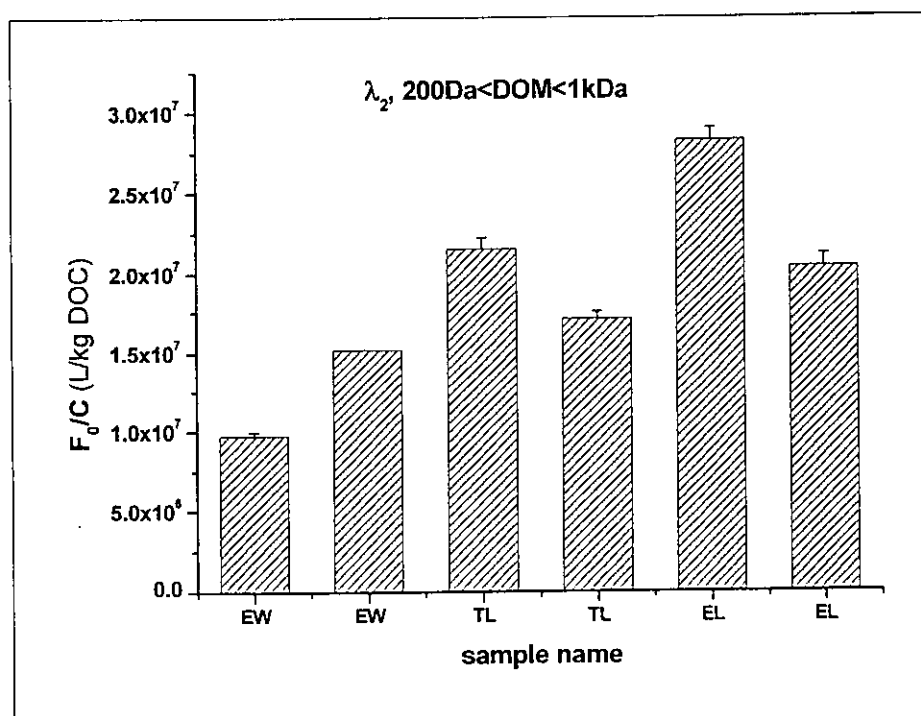
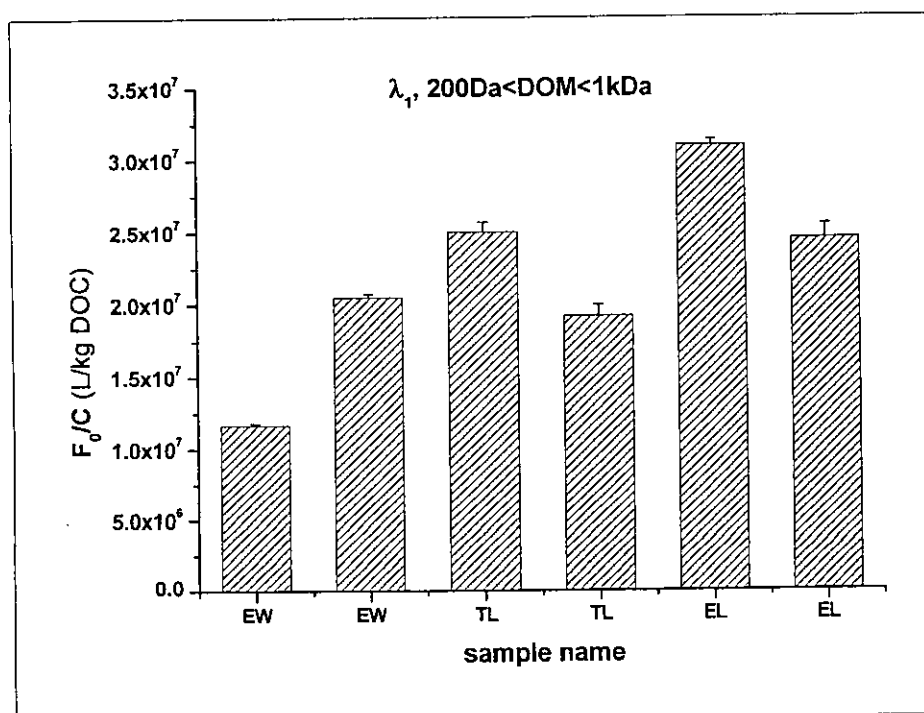
איור 8: מיקום הפיקים הפלואורסצנטיים (זוגות אורכי גל לעירור ופליטה), עבור דוגמאות חא"מ



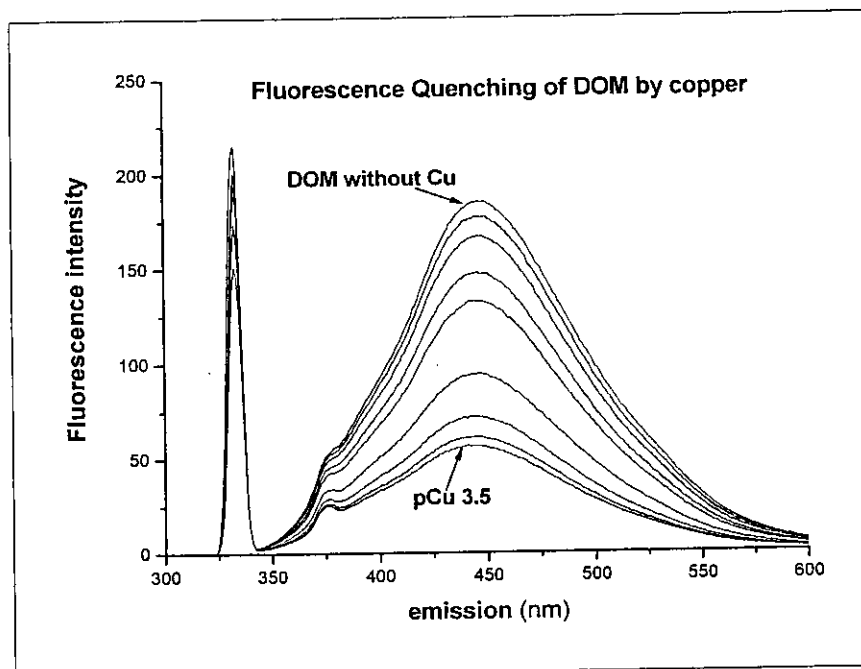
איור 9: עצמת הפלואורסצנטיה המנורמלת לריכוז הפא"מ, בדוגמאות חא"מ ללא תוספת נחושת
 -EW מי קולחים; TL- נקז לאחר השקיה במים שפירים; EL- נקז לאחר השקיה במי קולחים
 איור 9 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$



איור 9 ב': חא"מ במקטע הגודל $200 \text{ Da} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$



איור 10: דיכוי בעצמת הפלואורסצנטיה של דוגמת חא"מ בתוספת ריכוזי נחושת עולים



איור 11: עצמת הפלואורסצנטיה היחסית, כתלות בריכוז הנחושת הקשורה
 איור 11 א': חא"מ במקטע גודל $0.45 \mu\text{m} < \text{חא"מ} < 1 \text{ kDa}$

